

Synthetische „Nucleasen auf der Basis von Bis(guanidinium)alkoholen“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Zarghun Nazir
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

2004

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Wolfgang Goethe-Universität angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Göbel, Prof. Dr. Quinkert

Datum der Disputation: 20.12.04

Meinen Eltern

Vorwort

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden im Zeitraum von Mai 2000 bis Juli 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Göbel möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und für die hervorragende Betreuung in Form zahlreicher Anregungen sowie für die exzellenten experimentellen Bedingungen danken.

Die Verwirklichung dieser Arbeit wäre ebenfalls ohne die Mithilfe vieler MitarbeiterInnen in den Serviceabteilungen der Johann Wolfgang Goethe-Universität nicht möglich gewesen. Dabei gilt mein besonderer Dank dem Team um Dr. Zimmermann für die Messungen der NMR-Spektren, Frau Christof für die Anfertigung der Elementaranalysen, Frau Prieß und Frau Brill für die Messung der Massenspektren und Prof. Dr. Wagner für die Bereitstellung der Glove Box.

Der HPLC-Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. G. Dürner und seinem Team möchte ich besonders für die Analyse und Aufreinigung vieler Proben danken. Ohne die HPLC-Abteilung wäre die Synthese einiger wichtiger Verbindungen nicht möglich gewesen.

Weiterhin geht ein Dank an Frau Dr. U. Scheffer für die biochemischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Tipps und Anregungen. Ganz besonders bei Herrn Dipl. Chem. O. Boden, Herrn Dipl. Chem. S. Peter, Herrn Dipl. Chem. M. Hey, Herrn Dipl. Chem. G. Seiffert, Herrn Dipl. Chem. Spielmann, Frau Dipl. Chem. V. Ludwig, Herrn Dipl. Chem. A. Krebs, Herrn Dipl. Chem. C. Timm und Herrn Dipl. Chem. C. Gnaccarini.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

1	EINLEITUNG.....	1
2	PHOSPHORYLTRANSFERREAKTIONEN	2
2.1	Zur Konzeption der Enzymmimetika	6
2.2	Vorarbeiten zum Aufbau der Enzymmimetika	6
2.2.1	Verbindungen der ersten Generation	6
2.2.2	Verbindungen der zweiten Generation	8
2.2.3	Verbindung der dritten Generation	9
3.	ZIELSETZUNG	11
4	SYNTHESE	12
4.1	Einführung	12
4.1.1	Synthese von Bis(guanidinium)naphthol 18	14
4.1.2	Versuch der Synthese von Bis(guanidinium)phosphat 22	18
4.1.3	Synthese von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol 25	20
4.1.4	Versuche zur Synthese von Bis(guanidinium)carboxyamidin-naphthol 29	21
4.1.5	Synthese von Bis(mannich)naphthol 34	23
4.1.6	Synthese von Bis(guanidinium)oxochinon 39	26
4.1.7	Synthese von Mono(guanidinium)naphthol 40	28
4.1.8	Synthese von biotengelabeltem Bis(guanidinium)naphthol 59	29
4.1.8.1	Geplante Synthese von Methylester 48	32
4.1.9	Synthese von biotengelabeltem Bis(mannich)naphthol 65	36
4.1.10	Synthese von acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol 69	38
4.1.11	Synthese des acridingelabelten Bis(mannich)naphthols 75	40
4.1.12	Synthese von Bis(benzimidazol)-naphthol 77	42
4.1.13	Synthese von Benzimidazol-guanidinium-naphthol 82	43
4.1.14	Synthese von N-methyliertem Bisbenzimidazol 88	45
4.1.15	Synthese von Di-bis(guanidinium)naphthol 90	47
5	KINETIKEN DER BISKATIONISCHEN NAPHTHOLE MIT AKTIVIERTEN PHOSPHORSÄUREDIEESTERN.....	49
5.1	Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	52
5.1.1	Reaktion ohne Wasser	52

5.1.1.1 Der Einfluss der Aktivierung durch das Bis(guanidinium)gerüst 94	56
5.1.2 Reaktionen in Anwesenheit von Wasser	57
5.2 Reaktionen von Bis(mannich)naphthol 34 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	61
5.2.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser	61
5.2.2 Reaktion in Anwesenheit von Wasser	61
5.3. Reaktionen von Mono(guanidinium)naphthol 40 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	62
5.3.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser	62
5.4 Reaktionen von Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz der Tetramethylguanidin	63
5.4.1 Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Wasser	63
5.5. Reaktionen von Benzimidazol-guanidinium-naphthol 82 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz der Tetramethylguanidin	64
5.5.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser	64
5.6 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(4-dinitrophenyl)ester 9, Salz mit Tetramethylguanidin	65
5.6.1 Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Wasser	65
5.7 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäuremethylester-4-nitrophenylester 91, Salz mit Tetramethylguanidin	67
5.7.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser	67
6. PLASMIDSPALTUNG MIT DEN VERSCHIEDENEN BISKATIONISCHEN ALKOHOLEN	68
6.1 Plasmidspaltung mit den Verbindungen der zweiten und dritten Generation	69
6.2 Plasmidspaltung mit den Verbindungen der neuesten Generation	73
6.2.1 Plasmidspaltung mit Bis(mannich)naphthol 34	73

6.2.3. Plasmidspaltung mit acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol	69
6.2.4 Plasmidspaltung mit acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol	75
6.2.5 Mechanistische Studien der Plasmidspaltung durch Bis(mannich)naphthol	80
6.2.6 Plasmidspaltung unter sauerstofffreien Bedingungen	81
6.2.7. Hydrolytischer Mechanismus	84
6.2.8 Versuche zur alkylierenden Depurinierung von Plasmid-DNA durch Bis(mannich)naphthol	87
6.2.9 Kovalente Bindung von Bis(mannich)naphthol 34 an 5'-Phosphat	90
6.2.9.1 Stabilität der O-Phosphat-Bindung	90
6.2.10 Versuche zum Nachweis kovalenter Bindungen von biotinelabeltem Bis(mannich)naphthol 65 an DNA	93
6.2.11 Einfluss der Guanidiniumreste auf die Reaktivität der Bis(guanidinium)naphthole	96

7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....98

8. EXPERIMENTELLER TEIL101

8.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen	101
8.2.1 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure	102
8.2.1.1 Synthese von Naphth-1,8-diol	102
8.2.1.2 Synthese von 2-Iodisophthalnitril	104
8.2.1.3 Synthese von 4-(8'-Hydroxy-naphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzol	105
8.2.1.4 Synthese von 8-[2,6-Bis-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]-naphth-1-ol	106
8.2.1.5 Synthese von 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-sulfonsäure	107
8.2.1.6 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure	109
8.2.2 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Phosphorsäuremono-(2,4-dinitrophenyl)ester, Salz mit Monoacetat	111
8.2.3 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Phosphorsäuremono-(4-nitrophenyl)ester, Salz mit Monoacetat	112
8.2.4 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Adenosyl-5'-mono-phosphorsäure, Salz mit Trifluoressigsäure	114
8.2.5 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure	115
8.2.6. Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-N-hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin, Salz mit Pikrinsäure	117
8.2.6.1 Synthese von 4-(Chinolin-1'-yloxy)-3,5-Dicyanobenzol	117
8.2.6.2 Synthese von 8-[2,6-Bis-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]-2,3,4-dihydro-chinolin	118

8.2.6.3 Synthese von 8-[2,6-Bis-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]- <i>N</i> -hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin 38	120
8.2.6.4 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}- <i>N</i> -hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin, Salz mit Pikrinsäure 39	121
8.2.7 Synthese von 3-[(4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-2-(8'-hydroxy-naphth-1'-yloxy)-benzonitril, Salz mit Pikrinsäure 40	123
8.2.7.1 3-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylaminomethyl)-2-(8'-hydroxynaphth-1'-yloxy)-benzonitril 16	123
8.2.7.2 Synthese von 3-[(4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-2-(8'-hydroxy-naphth-1'-yloxy)-benzonitril, Salz mit Pikrinsäure 40	124
8.2.8 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-naphth-1-ol 59	126
8.2.8.1 Synthese von 1,3,5-Benzoltricarbonsäuretrimethylester 42	126
8.2.8.2 Synthese von 3,5-Dicyano-benzoesäuremethylester 45	127
8.2.8.3 Synthese von 3,5-Dicyano-4-iod-benzoesäuremethylester 47	129
8.2.8.4 Synthese von 4-(8'-Hydroxy-naphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzoesäuremethylester 37	130
8.2.8.5 Synthese von 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäuremethylester 52	132
8.2.8.6 Synthese von (6-Amino-hexyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester 55	133
8.2.8.7 Synthese von 6-(+)-Biotinylaminohexylcarbamidsäure- <i>tert</i> -butylester 57	134
8.2.8.8 Synthese von 8-{2',6'-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4'-carboxy-phenoxy}-naphth-1-ol 53	135
8.2.8.9 Synthese von 8-{2',6'-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-naphth-1-ol 58	137
8.2.8.10 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-naphth-1-ol 59	139
8.2.9 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz der Trifluoressigsäure 65	141
8.2.9.1 Synthese von (8-Amino-octyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester 61	141
8.2.9.2 Synthese von 8-(+)-Biotinylaminooctylcarbaminsäure- <i>tert</i> -butylester 62	142
8.2.9.3 Synthese von 8-{2',6'-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-naphth-1-ol 63	143
8.2.9.4 Synthese von 8-{2',6'-Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol 64	145
8.2.9.5 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz der Trifluoressigsäure 65	146

8.2.10 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Trifluoressigsäure 75	148
8.2.10.1 Synthese von 13-Amino-(4, 7, 10-trioxoTridecanyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester 71	148
8.2.10.2 Synthese von 13-(6-Chloro-2-methoxy-anthracen-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-yl-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester 72	149
8.2.10.3 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylaminomethyl)-4-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-naphth-1-ol 73	150
8.2.10.4 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylaminomethyl)-4-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol 74	152
8.2.10.5 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Trifluoressigsäure 75	153
8.2.11 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 78	155
8.2.11.1 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[N-(2-aminophenyl)-thioureidomethyl]-phenoxy}-naphth-1-ol 77	155
8.2.11.2 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 77	156
8.2.12 Synthese von 8-{2-[(1 <i>H</i> -Benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-6-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphthalin-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 82	158
8.2.12.2 Synthese von 8-[(2'-Benzimidazol-2'-ylamino)-methyl]-6'-cyano-8-hydroxy-naphth-1-ol 79	159
8.2.12.3 Synthese von 8-[2'-(1- <i>tert</i> -Butoxycarbonylbenzimidazol-2'-ylamino-methyl)-6'-(<i>tert</i> -butoxycarbonylaminomethyl)-1'-phenoxy]-naphth-1-ol 80	161
8.2.12.4 Synthese von 8-{2'-[(1 <i>H</i> -Benzimidazol-2'-ylamino)-methyl]-6'-[(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2'-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 82	162
8.2.13 Synthese von 1,3 Bis-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl-1-aminomethyl)-benzol 88	164
8.2.13.1 Synthese von [3-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-amino-methyl)-benzyl]-carbamidsäure- <i>tert</i> -butylester 84	164
8.2.13.2 Synthese von {3-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-methyl-amino)-methyl]-benzyl}-methyl-carbamidsäure- <i>tert</i> -butylester 85	165
8.2.13.3 Synthese von Bis-[N-(2-Nitro-phenyl)-thioureidomethyl]-benzol 87	166
8.2.13.4 Synthese von Bis-[N-(2-amino-phenyl)-thioureidomethyl]-benzol 86	167
8.2.13.5 Synthese von 1,3 Bis-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl-1-aminomethyl)-benzol 88	169
8.2.14 Synthese von 2-Dimethylaminomethyl-8-methoxy-naphth-1-ol 96	170
8.2.14.1 Synthese von 8-Methoxy-naphth-1-ol 93	170
8.2.14.2 Synthese von 2-Dimethylaminomethyl-8-methoxy-naphth-1-ol 111	171
8.3 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeiten	173
8.3.1 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	177

8.3.1.2.2 Stabilität von O-Phosphat 21 in DMF/Wasser/Base	184
8.3.1.2.3 Reaktion in DMF/Puffer	186
8.3.2 Referenzreaktionen	194
8.3.3 Reaktionen von Bis(mannich)naphthol 34 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	199
8.3.4 Reaktionen von Mono(guanidinium)naphthol 40 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	206
8.3.5 Reaktionen von Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	209
8.3.6 Reaktion von Benzimidazol-guanidinium-naphthol 82 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin	215
8.3.7 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 16 mit Phosphorsäure-bis(4-nitrophenyl)-ester 9, Salz mit Tetramethylguanidin	218
8.3.8 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäuremethylester-4-nitrophenylester 9, Salz mit Tetramethylguanidin in DMF/Hünig Base	225
8.4 Bestimmung der pKa-Werte von Naphtholderivate	228
8.4 1 Beschreibung der Methode zur Bestimmung der pKa-Werte	228
8.5 Plasmidspaltung der biskationischen Verbindungen	233
8.5.1 Allgemeine Vorschrift für die Isolierung von pUC19 durch Phenolextraktion und PEG8000-Reinigung ²⁸	233
8.5.2 Allgemeine Vorschrift für die Durchführung der pUC19-Spaltung mit bisakationischen Verbindungen	234
8.5.3 Allgemeine Vorschrift für die Isolierung von Form II der plasmidischen DNA	235
8.5.4 Allgemeine Vorschrift für die Plasmidspaltung durch EcoRI in Anwesenheit von Ethidiumbromid ²⁹	235
8.5.5 Allgemeine Vorschrift für die Ligation von Form II mit T4 DNA-Ligase in Anwesenheit von Ethidiumbromid	236
9 ANHANG.....	237
9.1 Daten zur Kristallstruktur von 19:	237
9.2 Atomnummierung von ausgewählten Naphtholverbindungen in der vorliegenden Arbeit:	251
9.3 Abkürzungsverzeichnis	253
9.4 Literaturverzeichnis:	254

1 EINLEITUNG

Mit der Aufklärung der DNA-Struktur vor etwa 50 Jahren durch James Watson und Francis Crick änderte sich die Vorstellung über das „Geheimnis des Lebens“ grundsätzlich. Vorher haben Biologen vor allem das Leben beobachtet. Nach dieser Entdeckung konnten sie es auf der molekularen Ebene erforschen. Damit entwickelte sich nicht nur die Molekularbiologie als neues Gebiet der Wissenschaft, sondern durch weitere Erfolge in der DNA- und RNA-Forschung auch die Biotechnologie, ohne deren Hilfe die Entschlüsselung des menschlichen Genoms vor kurzem nicht möglich gewesen wäre. Hieran knüpfen sich große Hoffnungen in der Medizin.

Auch das Gebiet der organischen Synthese hat sich mit der Zeit verändert. Diente die organische Synthese am Anfang vor allem zum Strukturbeweis¹, stand später der Aspekt der Herausforderung im Vordergrund. Dabei war z. B. die Synthese von Vitamin B₁₂ (1973) ein Meilenstein in der Naturstoffsynthese. Heute stehen in der Chemie neue Methodenentwicklung, Diversität in der Synthese und Design von Molekülen mit komplexen Funktionen (z. B. Nanostrukturen) im Mittelpunkt. Der Gedanke des gezielten Entwurfs von Molekülen ist mehr als ein Jahrhundert alt. Die früheren Beispiele sind die fiebersenkenden Medikamente Phenacetin (1868) und Acetylsalicylsäure (1897). Da man heute durch methodischen Fortschritt bei der Proteinkristallographie und bei den NMR-Methoden die dreidimensionalen Strukturen vieler wichtiger Proteine und ihrer Ligandenkomplexe aufgeklärt hat, versteht man die chemisch mechanistische Funktion von Enzymen viel besser. Aus diesem Grund sollte es mit Hilfe der neuen Technologien, z. B. der Biotechnologie², automatisierter Screeningmethoden mit hohem Durchsatz und der kombinatorischen Chemie möglich sein, kleine Moleküle nach dem Vorbild der Enzyme zu konzipieren, die wesentliche Aspekte von deren Funktionen nachahmen oder im günstigsten Fall voll erreichen. Eine ganze Reihe an wichtigen biochemischen Prozessen, wie Replikation, Transkription oder auch Spleißen der mRNA beruhen unmittelbar auf der Hydrolyse bzw. Umesterung von Phosphodiestern des DNA- und RNA-Rückgrats durch Enzyme. Die meisten Restriktionsendonukleasen erkennen DNA an einer vier oder sechs Nucleotide langen Sequenz und spalten die verknüpfende Phosphodiesterbindung an einer bestimmten Sequenz hydrolytisch. Durch ihre immense Stabilität stellen Phosphodiester eine besondere

Herausforderung für Enzymmimetika, den sog. künstlichen Nucleasen dar. Seit langem wird in unserer Arbeitsgruppe versucht, Moleküle zu synthetisieren, die in der Lage sein sollen, die hydrolytische Spaltung oder Umesterung von Phosphodiestern zu katalysieren.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung von Enzymmimetika der Typ-I-Topoisomerase beschrieben.^{3, 4, 5} Ziel der Arbeit war es, die Spalteffizienz bisher synthetisierter Verbindungen weiter zu erhöhen.^{6, 7, 8} Die Reaktivität wird zunächst mit künstlichen Phosphodiestern gemessen. Wenn die Reaktivität hoch genug ist, werden mit diesen Enzymmimetika dann Plasmid-DNA gespalten. Falls solche Katalysatoren eine gewisse Aktivität erreichen, könnte man sie dann mit Strukturelementen verknüpfen, die eine sequenzspezifische Erkennung ermöglichen.⁹ Über den wissenschaftlich intellektuellen Erfolg, das aktive Zentrum eines Enzyms erfolgreich in ein kleines Molekül transponiert zu haben, besteht dann die Möglichkeit einer Anwendung in der Biochemie und Molekularbiologie.¹⁰

2 Phosphoryltransferreaktionen

Die Phosphoesterbindung ist gegenüber hydrolytischer Spaltung viel stabiler als beispielsweise Amid- oder Esterbindungen.¹¹ Die Substitution an Phosphoester verläuft mechanistisch nicht einheitlich. Der Phosphomonoester wird in einem S_N-1 artigen Mechanismus gespalten.¹² Dabei entsteht ein kurzlebiges Metaphosphat.¹³

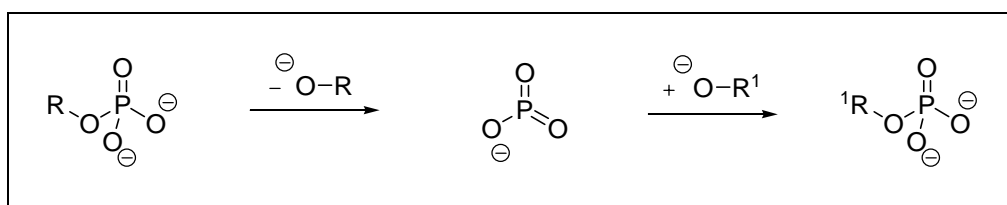
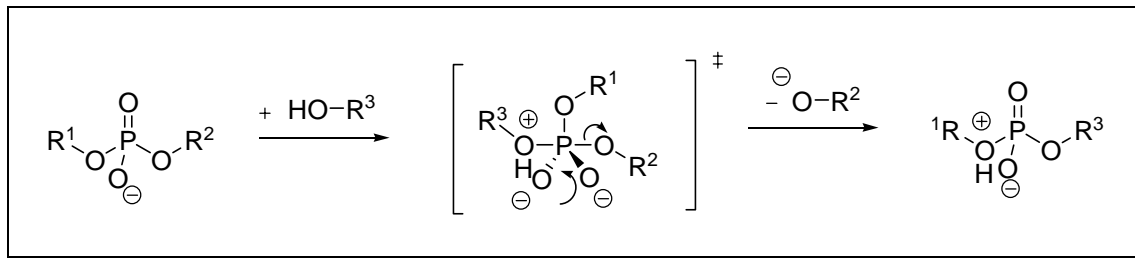


Abb.1: S_N-1 artiger Mechanismus

Phosphodiester werden dagegen nach einem S_N-2 artigen Mechanismus gespalten (Abb. 2).^{14,}

Abb. 2: S_N-2 artiger Mechanismus.

Dabei greift zunächst das Nucleophil das Phosphoratom an, wobei dieser Angriff auf Grund der hohen negativen Ladungsdichte in dessen Umgebung stark benachteiligt ist. Über den in der Abbildung 2 gezeigten trigonal-bipyramidalen Übergangszustand entsteht das Produkt. Auch dieser Übergangszustand ist stark benachteiligt, weil zum einen die negative Ladung verstärkt wird, zum anderen, wenn nicht saure und basische Gruppen einen Protonentransfer katalysieren, es zu einer Ladungstrennung käme. Auch die Produkte sind auf Grund der Ladungstrennung beim Phosphodiester und durch die negative Ladung am Alkoxid, benachteiligt. Die Benachteiligungen dieser Reaktion sind folgendermassen zu kompensieren:

- a) generelle Basenkatalyse
- b) generelle Säurekatalyse
- c) elektrophile Katalyse

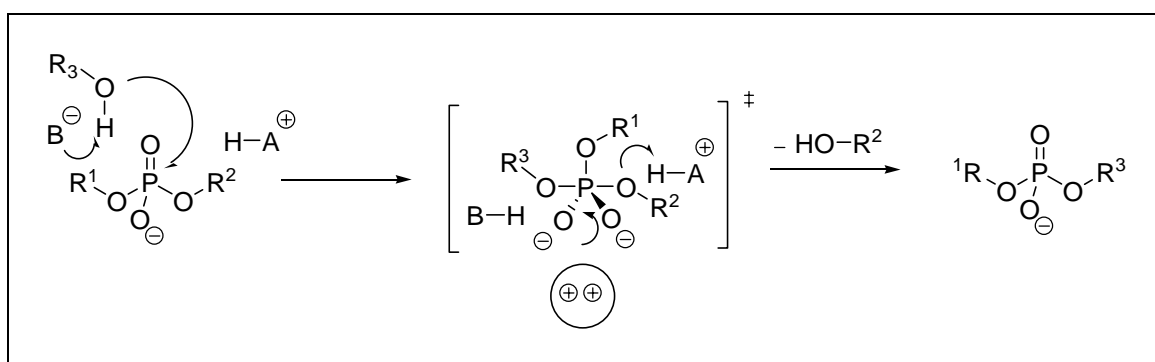


Abb.3: katalysierte Reaktion.

Wie Abbildung 3 zeigt, wird bei einer katalysierten Reaktion zunächst durch eine Base das Nucleophil deprotoniert. Dieses kann dann leichter das Phosphoratom angreifen. Im Übergangszustand ist die negative Ladung durch Kationen kompensiert und die

Abgangsgruppe wird durch eine Säure protoniert. Aus diesem Grund ist dieser Übergangszustand gegenüber demjenigen der nicht katalysierten Reaktion stark bevorzugt. Außerdem tritt hier beim Phosphodiesterprodukt keine Ladungstrennung auf und man erhält einen Alkohol.

Genau diese Art der Katalyse machen sich die natürlichen Enzyme zunutze. Man unterscheidet hierbei drei Arten der Enzyme:

1. Enzyme die Übergangsmetallionen nutzen;¹⁷
2. Enzyme die Hauptgruppenmetallionen verwenden, wie zum Beispiel die Staphylokokkennuclease;¹⁸
3. Metallfreie Enzyme, wie die Typ-I-Topoisomerase.⁵

Alle drei Enzymarten spalten Phosphodiester hydrolytisch. Metallhaltige Enzyme oder Metallionen wie z. B. Fe^{2+} , können Nucleinsäuren radikalisch oder auch oxidativ spalten. Damit werden die Substrate aber irreversibel verändert und können nicht wieder ligiert werden. Die Typ-I-Topoisomerase dagegen spaltet einen Phosphodiester reversibel durch Substitution mit Hilfe einer OH-Gruppe des Tyrosins. Aus diesem Grund kann dieser auch wieder ligiert werden. Genomische DNA liegt normalerweise superhelical vor und kann somit von Enzymen nicht für die Replikation oder Transkription, abgelesen werden. Die Topoisomerase ist jedoch in der Lage, die DNA zu relaxieren, indem sie den Grad der Superhelicalität verändert. Hierbei lagert sie sich an die DNA an, spaltet einen Einzelstrang, dreht diesen an der Stelle der Strangöffnung vollständig um die zentrale Achse und schließt dann den Einzelstrang wieder. Dies erfolgt im Einzelnen über folgende Teilschritte:

1. Bindung an der DNA;
2. Öffnung eines Stranges unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer Tyrosin OH-Gruppe und dem 5'-Phosphat;
3. eine vollständige Drehung der DNA an der Strangöffnung um die zentrale Achse;
4. Abtrennung des kovalent gebunden Enzyms und Wiederverknüpfung des Stranges.

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse eines kovalent und eines nicht kovalent gebundenen Komplexes zwischen einem 22 Basenpaare langen DNA-Doppelstrang und einem am NH-Terminus verkürzten Analogon der Typ-I-Topoisomerase wurde ihr aktives Zentrum identifiziert.⁵ Basierend hierauf wurde der folgende Umesterungsmechanismus postuliert:

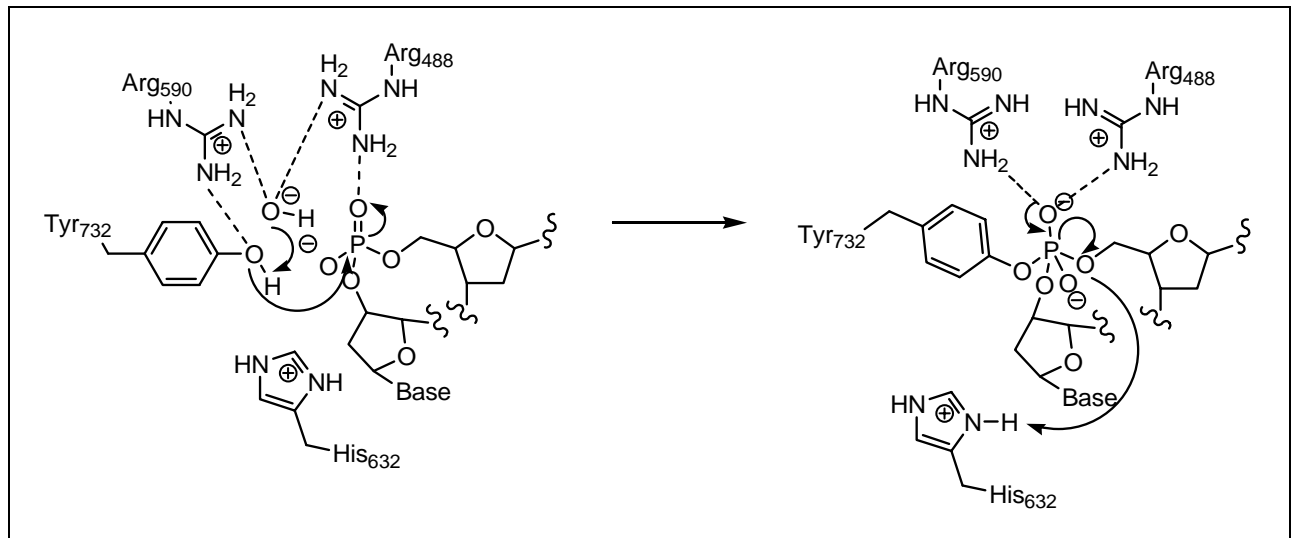


Abb. 4: Postulierter Mechanismus der Umesterung im Topoisomerase I Komplex.

Wie Abbildung 4 zeigt, wird zunächst die OH-Gruppe von Tyr-732 deprotoniert. Man vermutet, daß dabei ein Wassermolekül als generelle Base fungiert, da das Wassermolekül so positioniert ist, daß es sowohl mit Arg-488 als auch Arg-590 Wasserstoffbrücken ausbilden kann und somit als Hydroxyanion vorliegen muß. Als nächstes wird das Phosphoratom des Phosphorrückgrats nucleophil angegriffen. Über einen Übergangszustand, in dem die negativen Ladungen durch Arg-488, Arg-590 und His-632 kompensiert sind, wird der Strang gespalten. Der austretende 5'-Rest wird durch His-632 protoniert, welches somit als generelle Säure fungiert.

2.1 Zur Konzeption der Enzymmimetika

Ausgehend von der Struktur des aktiven Zentrums des Komplexes zwischen der Typ-I-Topoisomerase und einem 22 Basenpaare langen DNA-Doppelstrang, zeichnet sich ein klares Strukturmotiv für DNA spaltende künstliche Enzyme ab.

Zunächst muß solch ein künstliches Enzym eine als Nucleophil fungierende OH-Gruppe enthalten. Diese OH-Gruppe sollte an einem Aromaten gebunden sein. Dann muß es funktionelle Gruppen enthalten, die in der Lage sind, die Umesterung elektrophil zu katalysieren und als generelle Säure zu fungieren. Hierbei kommen Guanidinium-, Aminoimidazolium- und Benzimidazolium-Reste in Frage.

2.2 Vorarbeiten zum Aufbau der Enzymmimetika

2.2.1 Verbindungen der ersten Generation

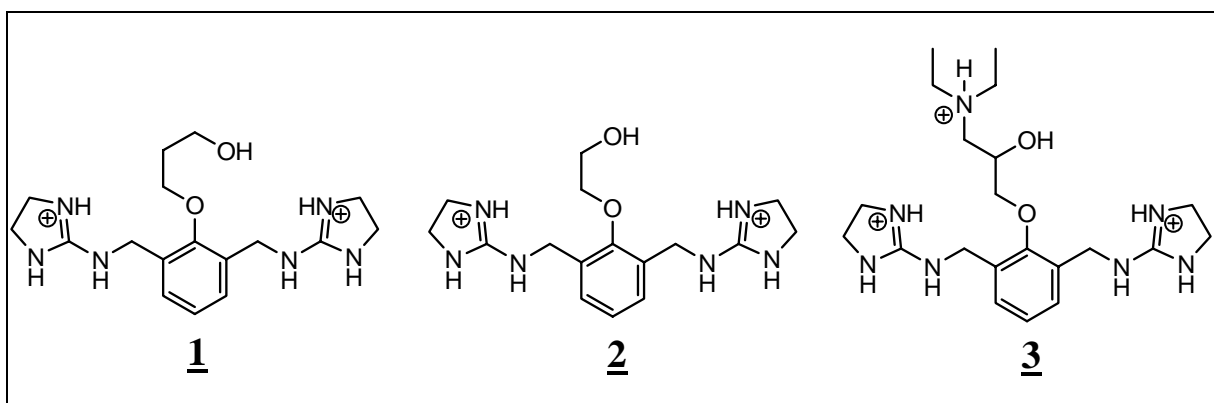
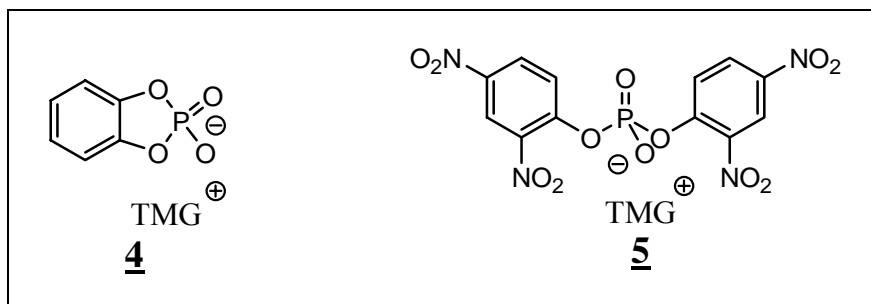


Abb. 5: Von M. Muche synthetisierte Verbindungen.

Die Abbildung 5 zeigt einige von M. Muche synthetisierte Verbindungen.⁶ Diese wurden zunächst mit dem sehr reaktiven Modellphosphat Catecholphosphat **4** in DMF/Hünigbase getestet:¹⁹



Diese Verbindungen reagierten mit dem Catecholphosphat **4** zu dem gewünschten O-Phosphat. Dabei stieg die Reaktivität in der gezeigten Reihenfolge von Verbindung **1** zu **3**. Man kann sehen, daß mit zunehmender Länge der das Nucleophil tragenden Kette, die Reaktivität der biskationischen Alkohole abnimmt. Denn mit zunehmender Länge der Seitenkette steigt ihre Flexibilität und somit auch ihre Entropie. Das führt dazu, daß die Wahrscheinlichkeit für den Zusammenstoß zwischen dem Nucleophil und dem Substrat abnimmt und somit auch die Geschwindigkeit der Reaktion. Danach wurden diese Verbindungen mit dem weniger reaktiven Modellphosphat Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester (2,4-BDNPP) **5** getestet. Keine dieser Verbindungen reagierte nur zu dem gewünschten O-Phosphat. Verbindung **3** wurde nur N-phosphoryliert, während Verbindungen **1** und **2** sowohl N- als auch O-phosphoryliert wurden.

2.2.2 Verbindungen der zweiten Generation

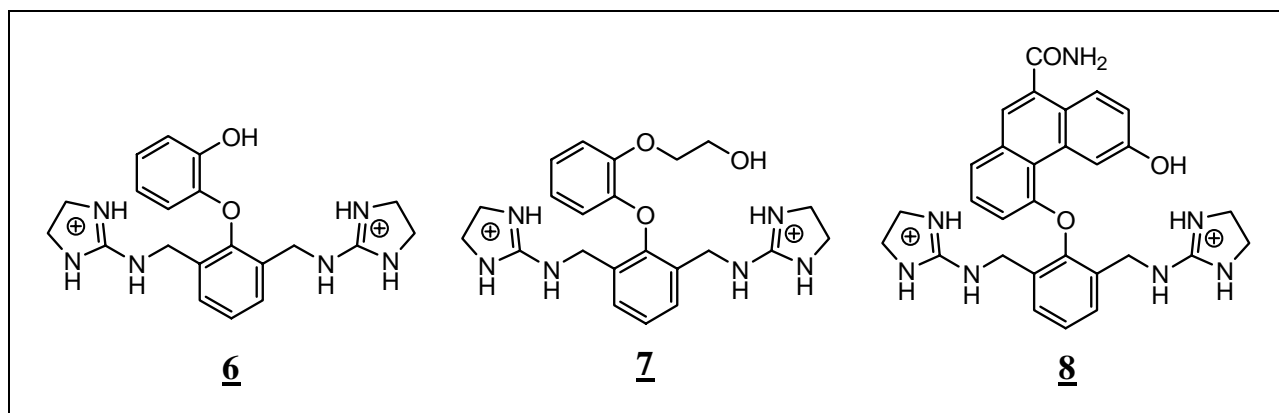


Abb. 6: von A. Büsing synthetisierte Verbindungen.

Wie die in der Abbildung 6 dargestellten Verbindungen zeigen, wurden die von M. S. Muche gemachten Erfahrungen von Arne Büsing für seine Verbindungen genutzt.⁷ Die Flexibilität der M. S. Muche Verbindungen wurde dadurch aufgehoben, daß die Seitenkette in ein aromatisches System eingebettet wurde. Damit wurde auch die Nucleophilie der OH-Gruppen erhöht. Diese Verbindungen zeigten eine deutlich höhere Reaktivität mit 2,4-BDNPP **5** in DMF/Hünigbase, als die Verbindungen von M.-S. Muche. Dabei steigt die Reaktivität in der gezeigten Reihenfolge von Verbindung **6** zu **8**. Das Phenanthren **8** war bis zu diesem Zeitpunkt die reaktivste Verbindung. Doch auch bei diesen Verbindungen entstanden sowohl N-Phosphate als auch O-Phosphate.

2.2.3 Verbindung der dritten Generation

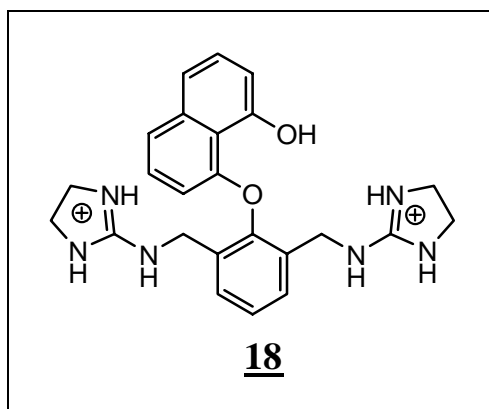


Abb. 7: während meiner Diplomarbeit synthetisierte Verbindung.

Das Bis(guanidinium)naphthol **18** in Abbildung 7 wurde von mir während der Diplomarbeit synthetisiert.⁸ Bei dieser Verbindung wurden die strukturellen Vorteile des Phenanthrens **8** ausgenutzt. Diese Verbindung war an der Seitenkette im Vergleich zum Phenanthren **8** um einen Aromaten verkürzt. Es stellte sich heraus, daß Bis(guanidinium)naphthol **18** die optimale Struktur eines künstlichen Enzyms besaß. Es reagierte mit dem 2,4-BDNPP **5** in DMF/Hünigbase um einen **Faktor 1.4** schneller als das Phenanthren **8**. Außerdem entstand ausschließlich das gewünschte O-Phosphat **21**. Da die Reaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** hoch genug war, wurde dieses auch mit dem weniger reaktiven Modellphosphat Phosphorsäure-bis(4-nitrophenyl)-ester (4-BNPP) **9** gemessen:¹⁴

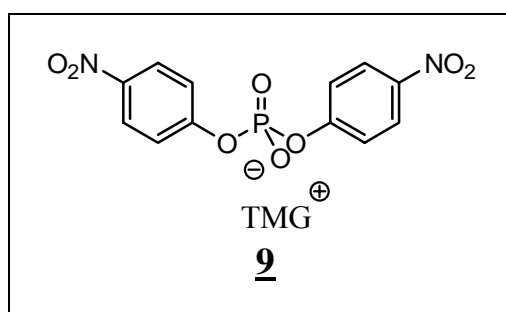


Tabelle 1: Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Bis(guanidinium)verbindungen mit 4-BNPP **9** (Reaktionsbedingung: 10 mM Guanidin, 30 mM 4-BNPP **9** in 250 mM Hünigbase und DMF bei 30 °C).

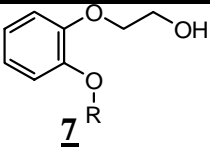
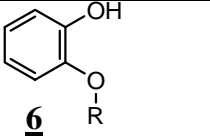
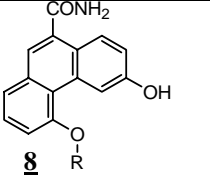
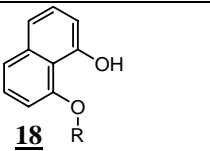
	O:-N-Phosphat	k _{obs} (min ⁻¹)
 7	2:1	8.4×10^{-6}
 6	2:1	2.0×10^{-6}
 8	3:1	6.0×10^{-5}
 18	O-Phosphat	2.2×10^{-4}

Tabelle 1 zeigt deutlich, daß das Bis(guanidinium)naphthol **18** die bis dahin reaktivste Verbindung war. Es reagierte mit dem 4-BNPP **9** um **Faktor 3.6** schneller als das Pheanthren **8**.

3. Zielsetzung

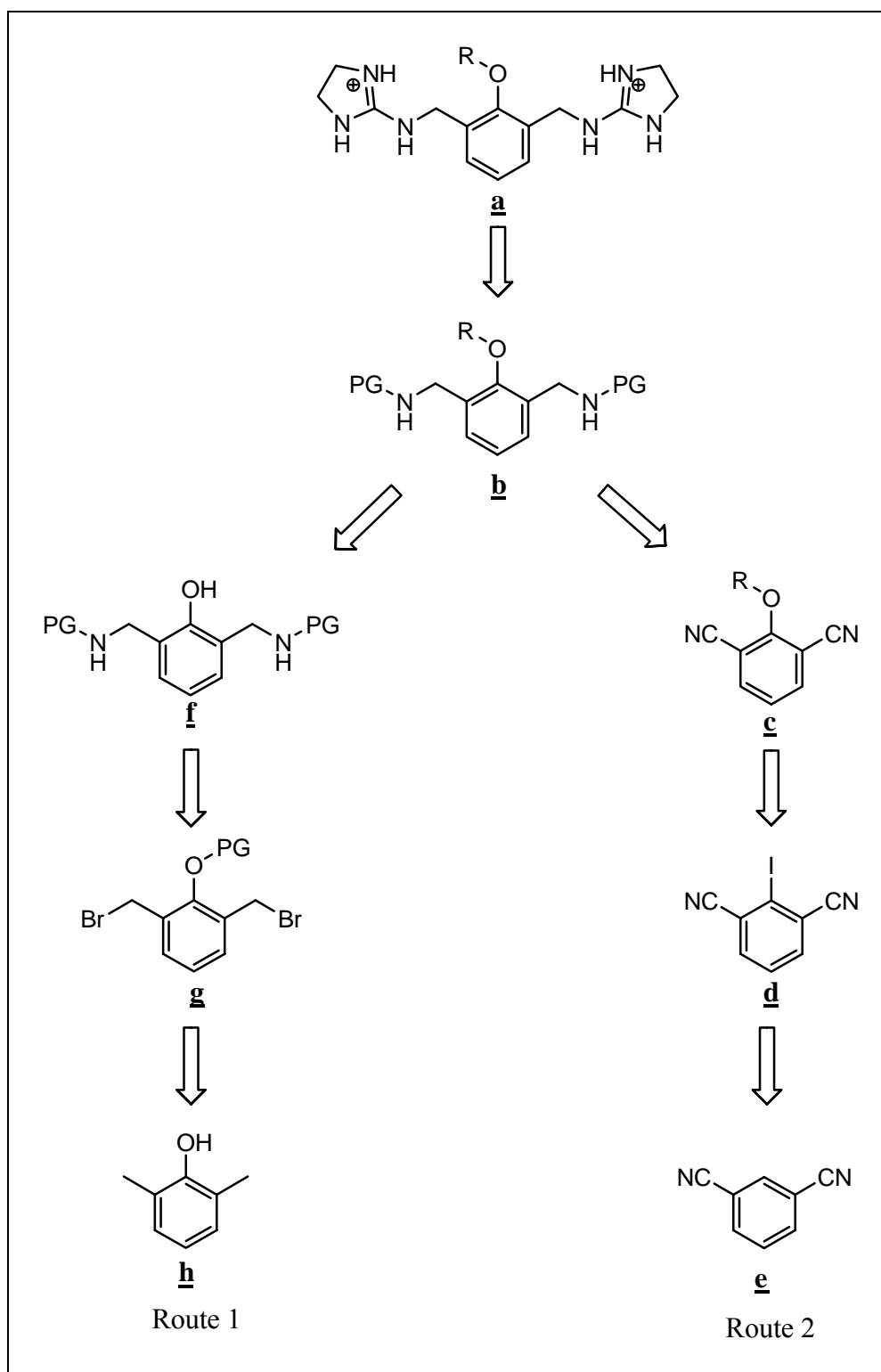
Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand darin, die Reaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** weiter zu erhöhen. Es hat sich gezeigt, daß der Nucleophil tragende Naphtholrest von **18** die optimale Länge für die Reaktivität besaß. Eine Änderung der Kettenlänge erscheint nicht sinnvoll. Doch die Einführung einer Hilfsbase in *ortho*-Position zu der OH-Gruppe, würde dessen Nucleophilie weiter erhöhen und somit ebenfalls die Reaktivität. Auch die dadurch entstehende positive Ladung würde einen zusätzlichen Beitrag zu der elektrophilen Katalyse liefern. Daß dies durchaus möglich ist, wurde von M. Muche bewiesen.⁶ Denn die Verbindung **3** mit der Hilfsbase war reaktiver als Verbindung **2**. Nun ist es aber auch denkbar, daß man durch Austausch der Guanidiniumreste durch Benzimidazole, die Reaktivität weiter erhöht. Denn der pK_s -Wert von 2-Aminobenzimidazolen liegt zwischen 7 und 8.²⁰ Damit können sie im physiologischen pH-Bereich sowohl protoniert als auch deprotoniert vorliegen und somit neben der generellen Säurekatalyse auch einen Beitrag zu der generellen Basekatalyse liefern. Guanidine und Aminoimidazole dagegen haben einen pK_s -Wert zwischen 13 und 14.²¹ Damit liegen sie im physiologischen pH-Bereich vollständig protoniert vor und können keinen Beitrag zu einer generellen Basekatalyse liefern. Eine weitere Möglichkeit, die Reaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** zu verbessern, besteht darin, die Verbindung über einem Linker mit einem Acridinrest zu verbinden.²² Da Acridine mit den Basen der DNA interkalieren, kann man dadurch die Bindungsaffinität des Katalysators zur DNA und somit die Effizienz der katalysierten Reaktion erhöhen.

Das nächste Ziel der Doktorarbeit bestand nun darin, mit den reaktivsten Verbindungen Plasmid-DNA in wässrigen gepufferten Medien hydrolytisch zu spalten.^{24, 25, 26}

4 Synthese

4.1 Einführung

Retrosynthetisches Konzept zur Herstellung biskationischer Alkohole:



Schema 1: Die beiden Routen zur Synthese von biskationischen Alkoholen.

Wie in Schema 1 gezeigt, lassen sich die biskationischen Alkohole des Typs **a** im allgemeinen auf zwei Routen synthetisieren. Bei beiden Wege lassen sich die biskationische Alkohole **a** auf einem gemeinsamen Vorläufer vom Typ **b** zurückführen. Dabei werden die freien Amine der Verbindung **b** ohne synthetische Komplikation in Kationen des Typs **a** überführt. Die Verbindungen des Typs **b** wiederum sind auf zwei unterschiedlichen Routen zugänglich. Bei der ersten Route werden sie aus der Verbindung **f** synthetisiert.⁶ Dabei reagiert die OH-Gruppe der Verbindung **f** mit einem Alkyl- oder Phenylhalogenid. In diesem Fall ist das Kerngerüst das Nukleophil und die Seitenkette das Elektrophil. Die Verbindung **f** wiederum geht durch Aminierung und selektive Entschützung aus dem Dibromid **g** hervor. Die Verbindung **g** kann man durch Schützen der OH-Gruppe und radikalische Seitenkettenbromierung aus dem kommerziell erhältlichen 2,6-Dimethylphenol **h** synthetisieren. Bei der zweiten Route geht die Verbindung **b** durch Hydrierung der Nitrilgruppen und gleichzeitigem Schützen der entstandenen Aminofunktionen aus Verbindung **c** hervor. Die Verbindung **c** wiederum ist aus Verbindung **d** zugänglich. Dabei reagiert die OH-Gruppe der Seitenkette mit dem Halogenid des Kerngerüsts. Im Gegensatz zur ersten Route ist hier die Seitenkette das Nukleophil und das Kerngerüst das Elektrophil. Die Verbindung **d** geht durch Iodierung aus dem kommerziell erhältlichen Isophthaldinitril **e** hervor.²⁷ Die verschiedene Bisguanidinium-naphthole in dieser Arbeit wurden im Prinzip alle nach der zweiten Route synthetisiert. Dabei werden die Vorteile genutzt, die durch die Cyanogruppen (Abb. 8) entstehen.

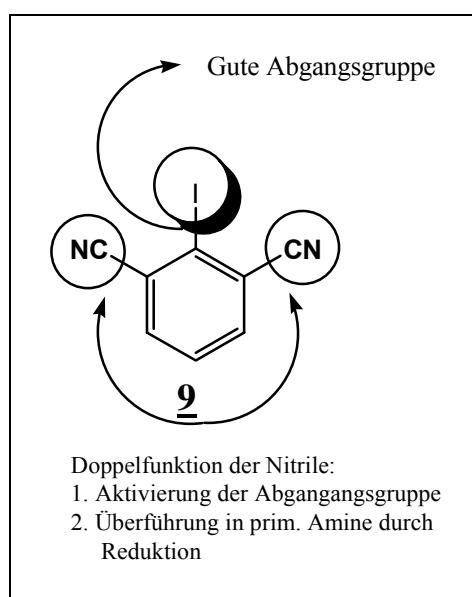
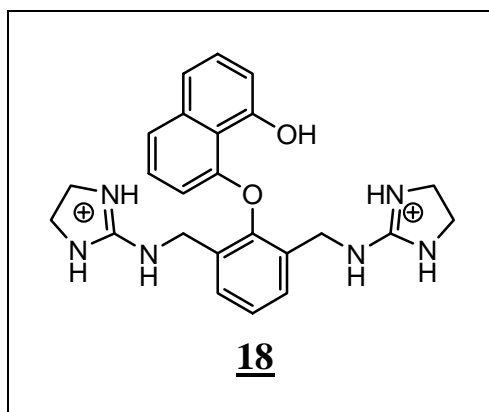


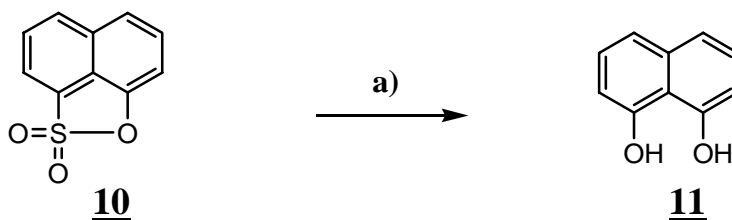
Abb. 8: Struktur von Iodisophthaldinitril **9**.

Wie Abbildung 8 zeigt, ist durch die beiden Cyanogruppen die Position 2 stark aktiviert, damit ist das Iodatom eine gute Abgangsgruppe. Weil die Cyanogruppen sterisch weniger anspruchsvoll sind als Methylgruppen, ist das Iodatom leicht durch ein Naphtholat ersetzbar. Nach der Kupplung kann man die Nitrile durch geeignete Bedingungen in primäre Amine umwandeln.

4.1.1 Synthese von Bis(guanidinium)naphthol 18

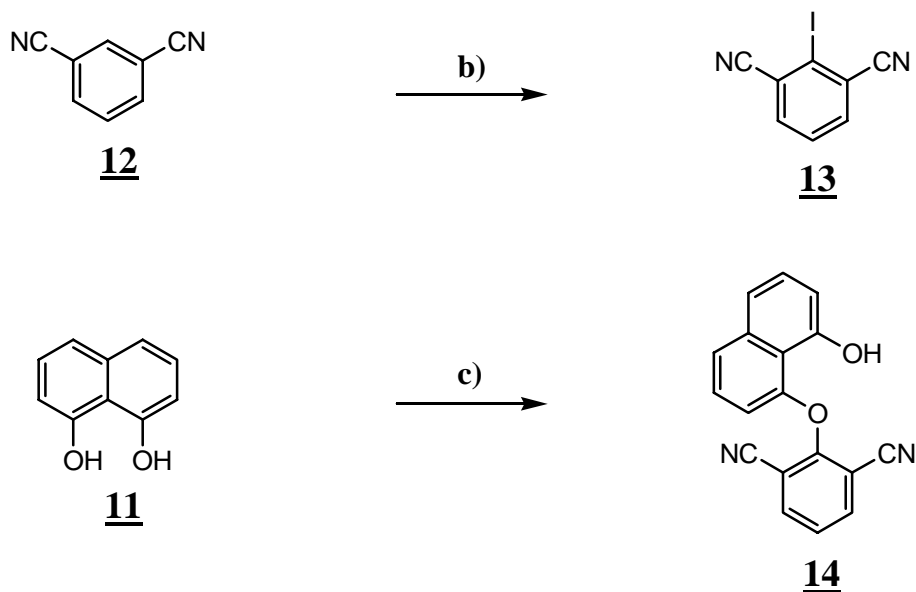


Das Bis(guanidinium)naphthol 18 wurde bereits während meiner Diplomarbeit synthetisiert.⁸ Im folgenden ist die verbesserte Synthese dargestellt. Das Naphthsulton 10 konnte mit einer guten Ausbeute in einer Alkalischmelze in das gewünschte Naphthol 11 überführt werden.²⁸



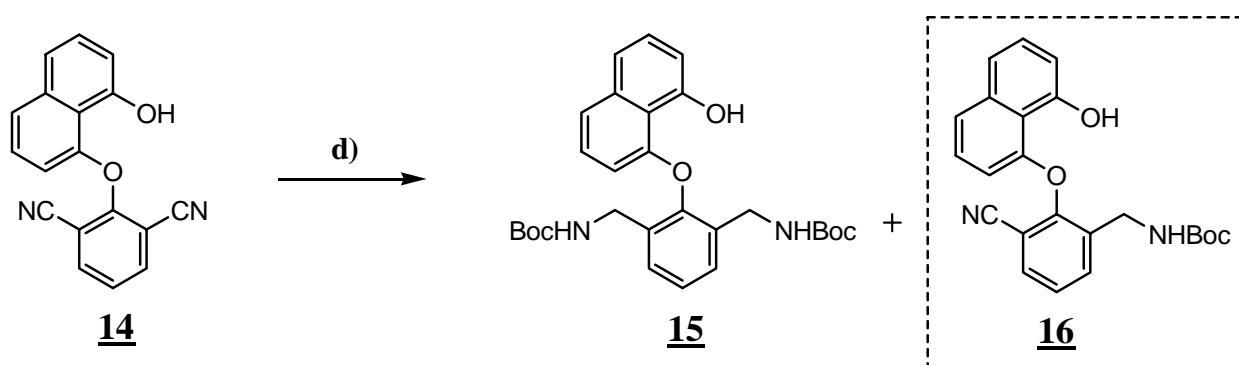
a) KOH, 242 °C, 2 h, 83 %

Zunächst wurde das Isophthalsäuredinitril **12** nach einer bekannten Vorschrift²⁷ iodiert und dann mit dem Diol **11** mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 65 % gekuppelt. Die Ausbeute konnte weder durch längere Reaktionszeiten, noch durch den Überschuss an Iodisophthalsäuredinitril **13** verbessert werden. Es gelang jedoch, nicht umgesetztes **11** einfach wieder zurück zu gewinnen.

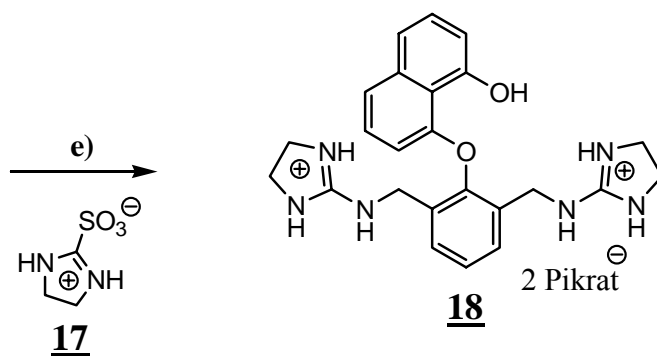


b) abs. THF, LDA, -80 °C, I₂, 81 %
c) abs. DMF, NaH, 110 °C, 4 h, 65 %

Anschließend wurde die gewünschte Verbindung **15** durch Hydrierung der Dinitrilverbindung **14** und gleichzeitiges Schützen der entstandenen Amine mit Boc₂O in einer Druckapparatur, synthetisiert. Als Nebenprodukt erhielt man das einfach geschützte Naphthol **16** mit einer Ausbeute von 20 %. Die Ausbeute des zweifach geschützten Naphthols **15** konnte weder durch längeren Reaktionszeiten und höheren Temperaturen noch durch höheren H₂-Druck verbessert werden. Damit wurde vielmehr die Bildung von Nebenprodukten noch erhöht. Danach wurde die Verbindung **15** mit TFA/CH₂Cl₂ entschützt und mit Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zum Bis(guanidinium)naphthol **18** umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ausfällung des Pikrat-Salzes.



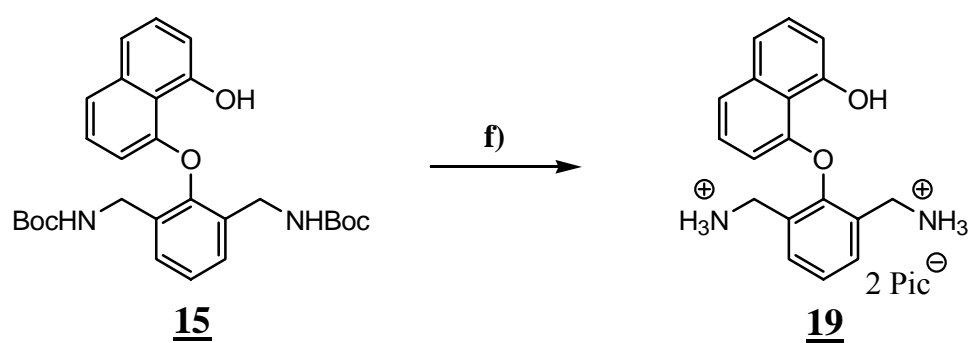
d) Boc₂O, Pd/C, abs. MeOH, 55 °C, 40 bar H₂-Druck, 42 h, 64 %



e) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h
2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h
3. Pikrinsäure, 73 %

Um möglichst exakte Strukturdaten zu erhalten, wurde versucht, das Bis(guanidinium)naphthol **18** zu kristallisieren. Hierzu wurde es in verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert; jedoch wurde immer ein gelbes amorphes Pulver isoliert. Auch als Chlorid- und Sulfat-Salz konnten keine Kristalle von Bis(guanidinium)naphthol **18** erhalten werden.

Daher wurde versucht, von freien Aminen der Verbindung **15** Kristalle zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die Verbindung **15** mit TFA in CH₂Cl₂ entschützt und mit hohen Ausbeute in das Pikrat-Salz **19** überführt. Aus MeOH/H₂O konnten orangene dünne kristalline Blättchen isoliert werden.



f) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h, Pikrinsäure, 90 %

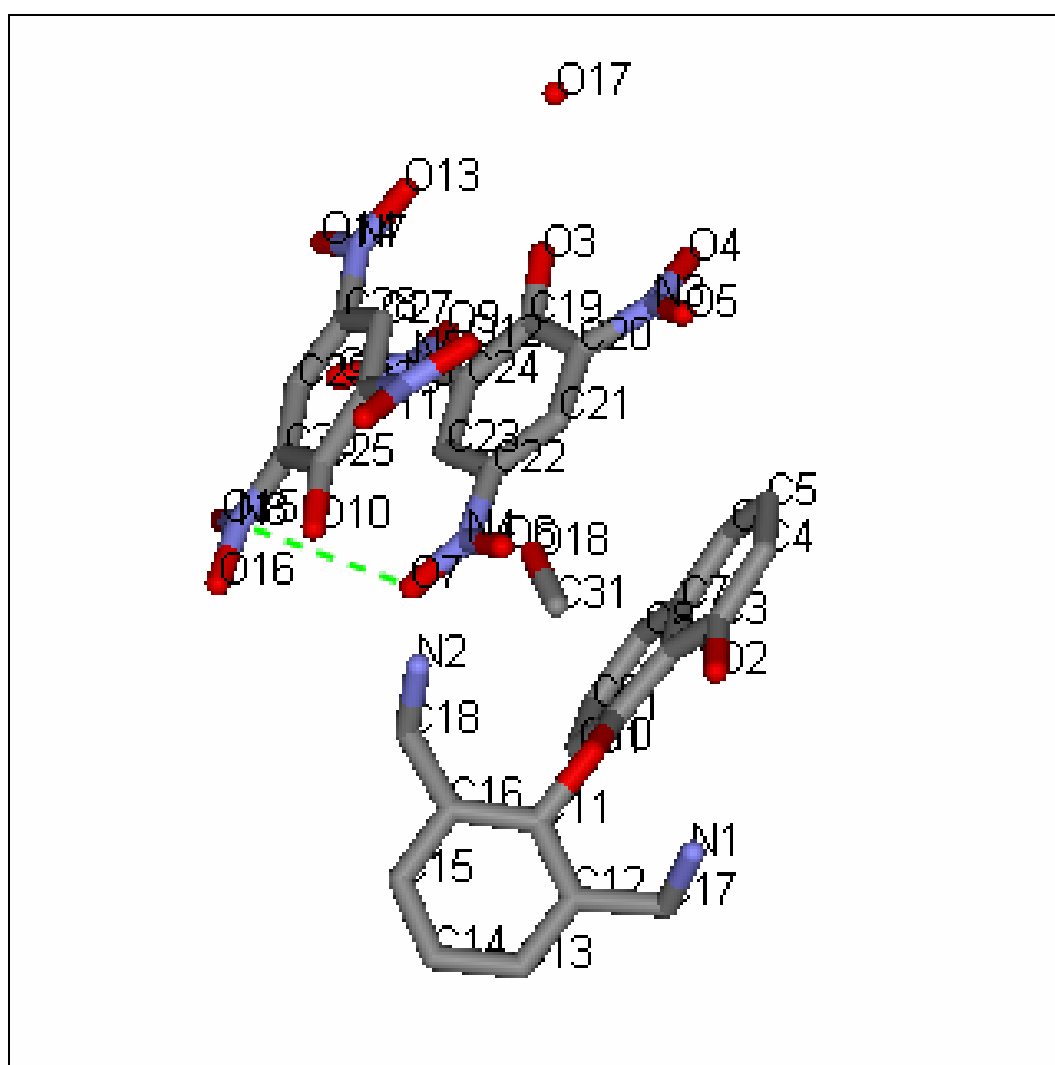


Abb. 9: ViewerLite3D-Darstellung des **19** im kristallinen Zustand; Zur besseren Übersicht wurden die H-Atome weggelassen.

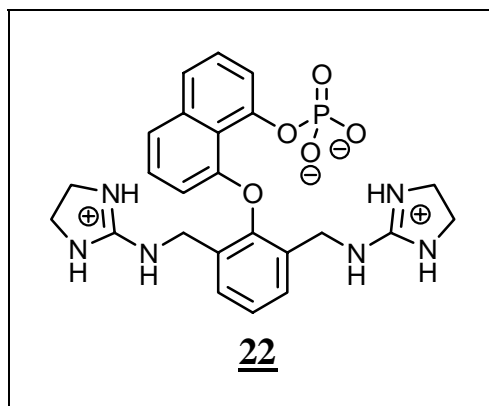
Diskussion der Struktur:

Wie die Kristallstruktur von Pikrat **19** zeigt, besitzt der Naphtholrest keine planare Struktur: O(1)-Atom weicht um 0.34 Å und der O(2)-Atom um 0.25 Å ab. Der Winkel zwischen dem Naphthol- und dem Phenylrest beträgt 68°. Damit steht der Naphtholrest fast senkrecht zum Phenylrest. Es gibt eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken. Das Wassermolekül besitzt zwei Akzeptor-Wasserstoffbrücken, eine zur Hydroxygruppe O(2)-HO(2) und eine zur NH-Gruppe. Außerdem besitzt es zwei Donor-Wasserstoffbrücken zu den beiden Pikraten.

Die NH_3^+ -Gruppe von C(17) besitzt drei Donor-Wasserstoffbrücken: Eine zum Pikrat, eine zum Wasser und eine gabelförmige intramolekulare zu O(1) und O(2).

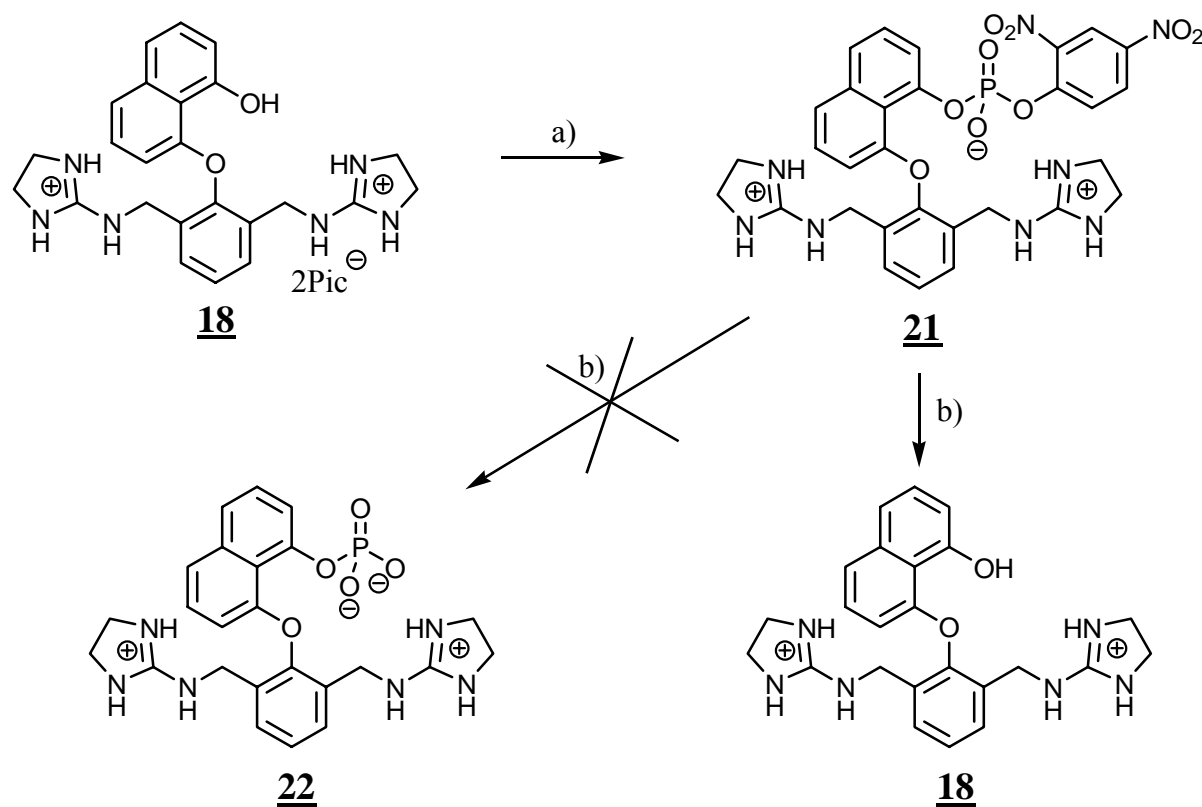
Die NH_3^+ -Gruppe von C(18) besitzt ebenfalls drei Donor-Wasserstoffbrücken: Zwei zu den Pikraten und eines zum Methanol.

4.1.2 Versuch der Synthese von Bis(guanidinium)phosphat **22**



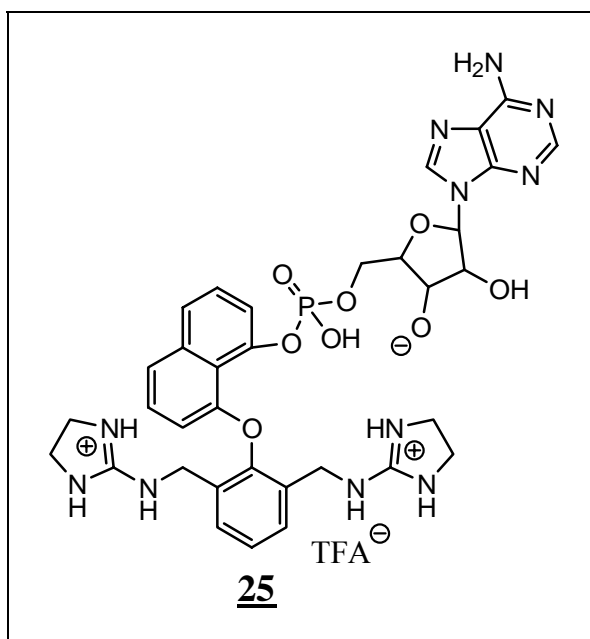
Um die Stabilität des Bis(guanidinium)phosphats **22** in Wasser zu messen und um davon auch Kristalle zu erhalten, wollte man dieses aus Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-BDNPP **5** über Bis(guanidinium)dinitrophenylphosphat **21** synthetisieren. Dabei wurden die Reaktionen mittels reversed phase HPLC verfolgt. Binnen 3 h setzte sich das ganze Bis(guanidinium)naphthol **18** in DMF/Hünigbase zum gewünschten Bis(guanidinium)dinitrophenylphosphat **21** um. Dennoch konnten nur 41 % isoliert werden. Der Grund hierfür lag in der Labilität von Verbindung **21**. Denn das Lösungsmittel musste im

Vakuum entfernt werden und dabei setzte sich laut HPLC der größte Teil des Bis(guanidinium)dinitrophenylphosphat **21** weiter um. Beim nächsten Schritt wurde **21** in DMF/H₂O (2:1) aufgelöst, bei RT gerührt und die Reaktion mittels reversed phase HPLC und Dünnschichtchromatographie verfolgt. Dabei war deutlich zu sehen, daß das Bis(guanidinium)dinitrophenylphosphat **21** sich sowohl zum Bis(guanidinium)phosphat **22** als auch zum Bis(guanidinium)naphthol **18** umsetzte. Doch nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum konnte kein Bis(guanidinium)phosphat **22** isoliert werden. Denn laut HPLC setzte sich der größte Teil sowohl zu Bis(guanidinium)naphthol **18**, als auch zu anderen unbekannten Verbindungen um.

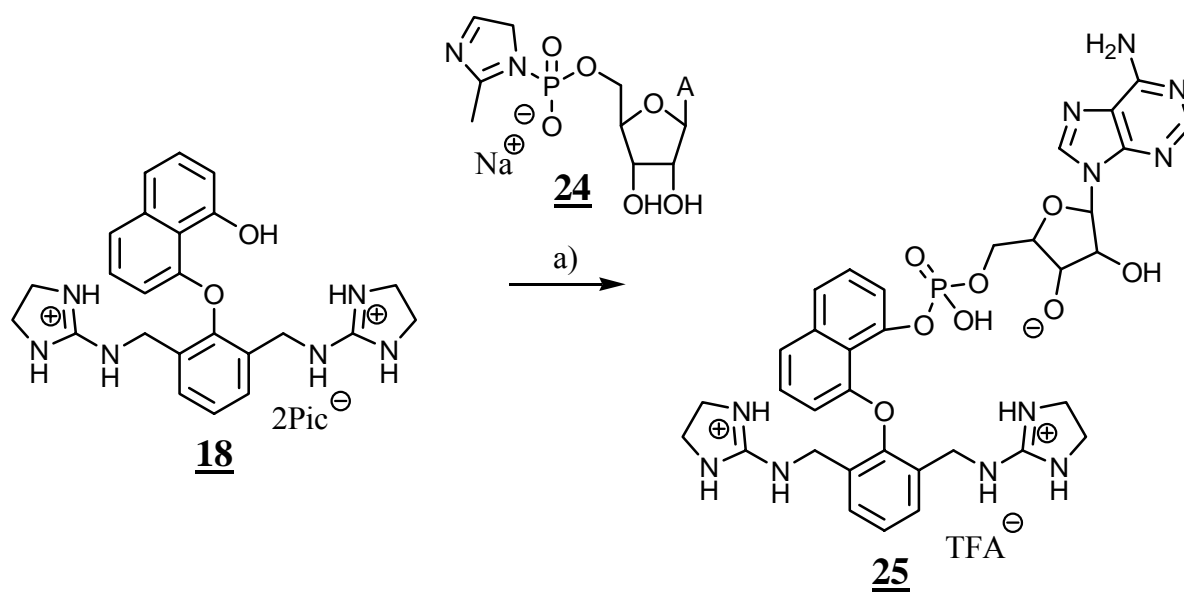


a) abs. DMF/250 mM HB, 2,4-BDNPP **5**, RT, 3 h, 41 %, b) DMF/H₂O (2:1), RT, 12 h, Zersetzung beim Versuch der Isolierung von **22** zu **18** und unbekannten Verbindungen!

4.1.3 Synthese von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol 25

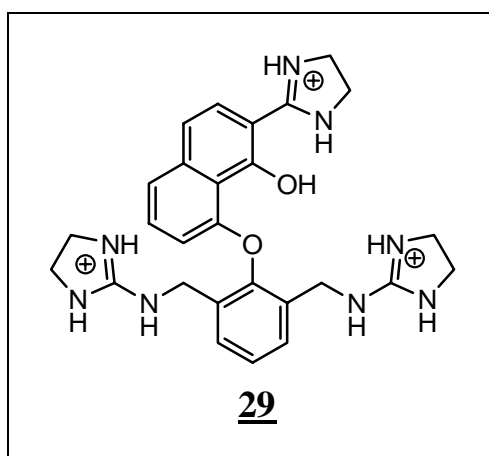


Um Hinweise auf die Stabilität der Bindung zwischen dem Katalysator und der DNA zu erhalten, wurde das Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** aus Bis(guanidinium)naphthol **18** und Adenosinphosphoimidazolid **24** mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 53 % erhalten. Die Reinigung der Probe erfolgte durch präparativer reversed phase HPLC. Wie dieses Beispiel zeigt, müsste es auch möglich sein, auch größere Nucleotide mit Bis(guanidinium)naphthol **18** zu kuppeln.



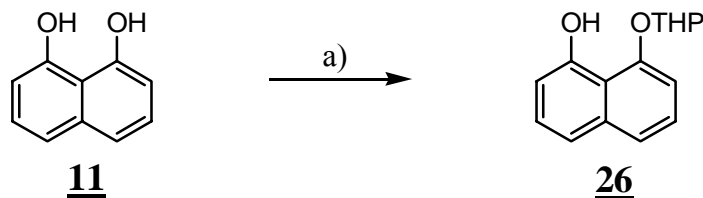
a) abs. DMF/250 mM HB, Adenosinphosphoimidazolid **24**
RT, 7 h, 53 %,

4.1.4 Versuche zur Synthese von Bis(guanidinium)carboxyamidin-naphthol **29**



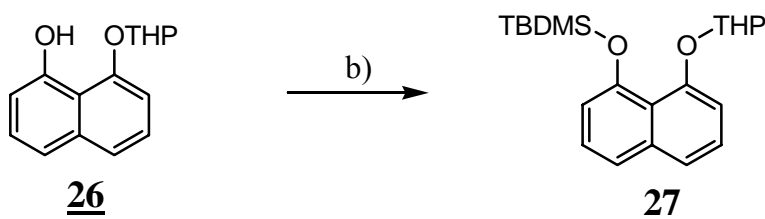
Durch Einführung eines Amidiniumrestes in der *ortho* -Position zur Hydroxygruppe sollte sich die Reaktivität von Bis(guanidinium)naphthol **18** weiter erhöhen. Deswegen wurde

zunächst das Diol **11** mono-THP geschützt.²⁹ Die zweite Hydroxygruppe konnte aufgrund sterischer Gründe nicht weiter mit THP umgesetzt werden.



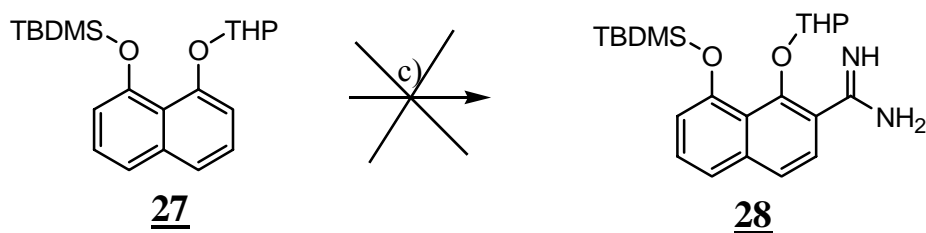
a) CH₂Cl₂, Dihydropyran, Pyridinium-p-toluolsulfonat, RT, 4 h, 83 %

Daher wurde entschieden, die verbleibende Hydroxygruppe mit TBDMS zu schützen.³⁰ Man erhielt mit einer sehr guten Ausbeute die Verbindung **27**.



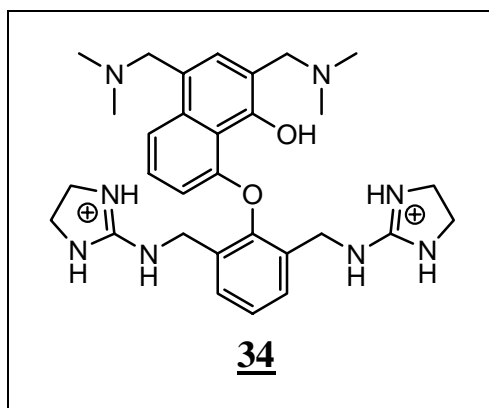
b) CH₂Cl₂, TBDMS-Cl, NaH, 40 °C, 5 h, 98 %

Als nächstes wurde versucht, das zweifach geschützte Diol **27** in *ortho*-Position zur THP-Gruppe zu lithieren und dann zu der gewünschten Amidiniumverbindung **28** umzusetzen. Allerdings gab es unter Standardbedingungen keine Umsetzung zur gewünschten Amidinverbindung **28**. Man erhielt immer das zweifach geschützte Diol **27** zurück. Auch bei höheren Temperaturen erfolgte keine Umsetzung. Auf dieser Stufe wurde die Synthese zu der Zielverbindung **29** abgebrochen. In einer neuen Synthesestrategie wurde eine andere Base in der *ortho*-Position der Hydroxygruppe eingeführt.

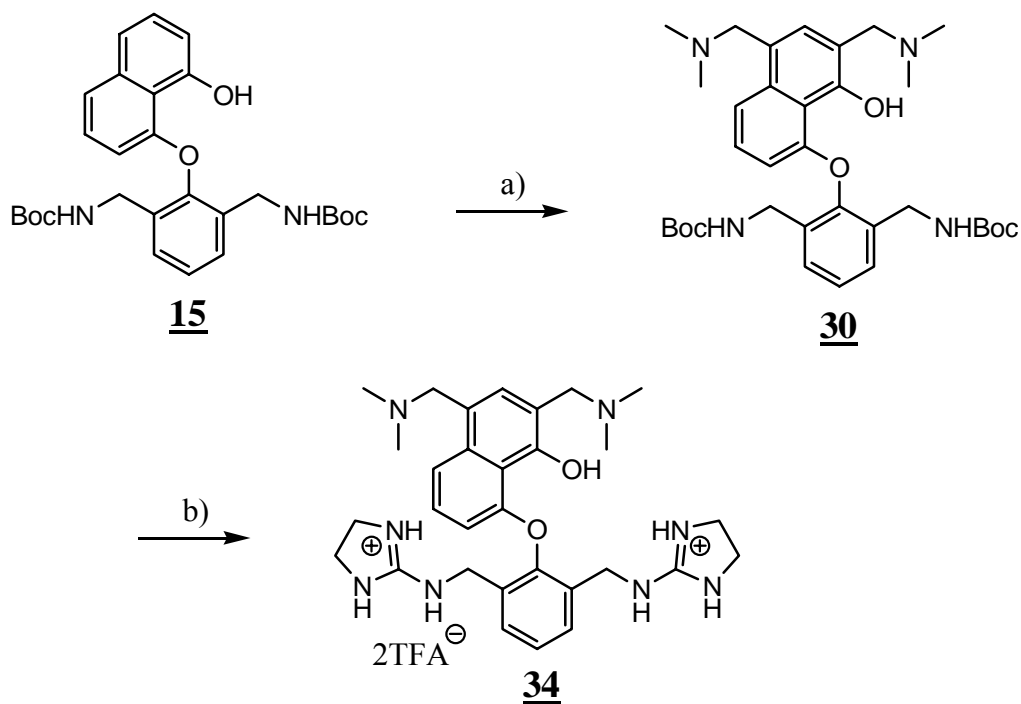


c) abs. THF, TMEDA, n-BuLi, Bis(trimethylsilyl)carbodiimid,
-90 °C, 2 h

4.1.5 Synthese von Bis(mannich)naphthol **34**

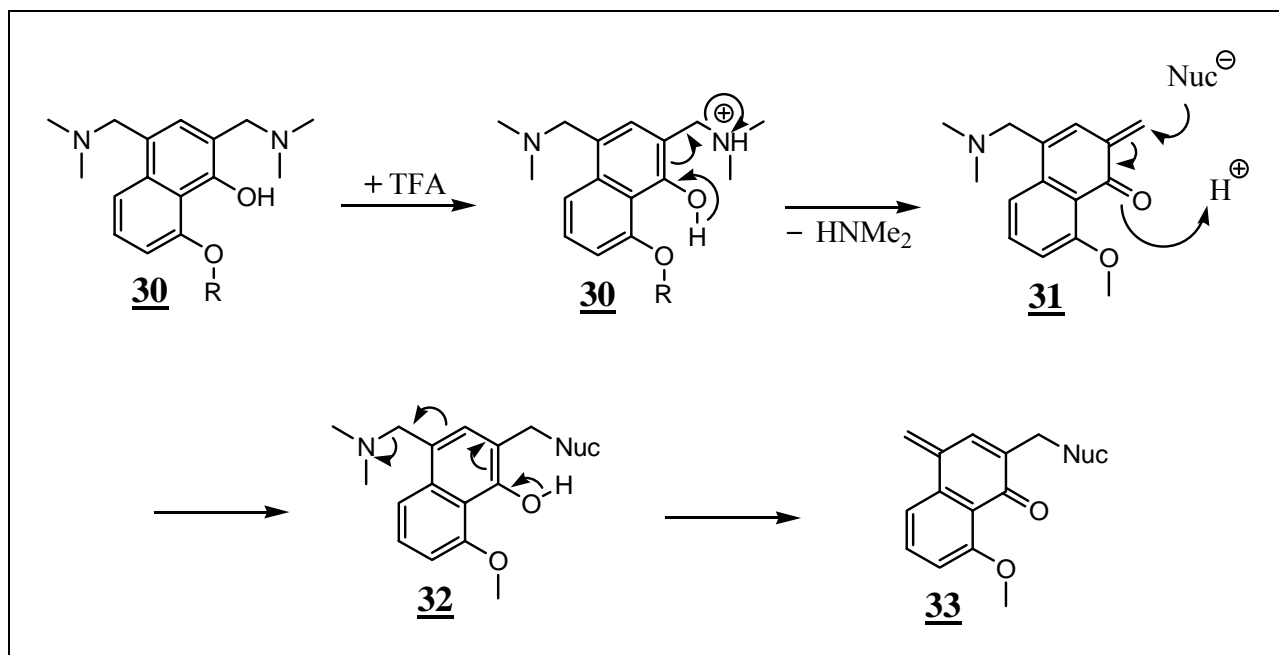


Die Syntheseroute des Bis(guanidinium)naphthols **18** (4.1) legt nahe, daß man sowohl bei Verbindung **15** als auch beim Bis(guanidinium)naphthol **18** die Mannichbasen einführen kann. Beide Wege wurden realisiert. Die Bismannichverbindung **30** konnte ohne Probleme nach der bekannten Vorschrift mit sehr guter Ausbeute synthetisiert werden.³¹



a) CH₃CN, N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, 60 °C, 95 % b) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h 2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, 5 %

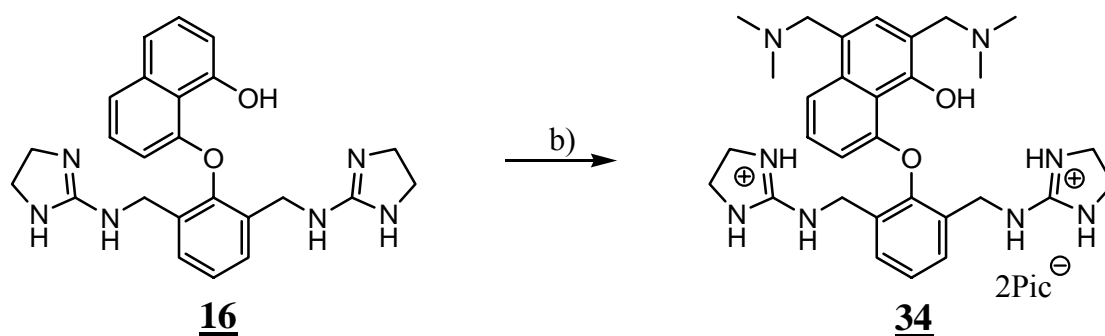
Die Boc-Schutzgruppen der Bis(mannich)verbindung **30** wurden unter HPLC-Kontrolle mit TFA abgespalten. Dabei konnte man feststellen, daß mit der Zeit mehrere polare Verbindungen entstanden sind. Als keine Bis(mannich)verbindung **30** mehr vorhanden war, wurde die Reaktion analog zu Bis(guanidinium)naphthol **18** fortgesetzt. Die Probe wurde dann mit präparativer reversed phase HPLC im Säuren gereinigt. Es konnte aber nur sehr wenig des gewünschten Bis(mannich)naphthols **34** isoliert werden. Der Grund dafür lag in der Säurelabilität der Bis(mannich)naphthol **34**.³¹



Schema 2: Mögliche Reaktionen von Bis(mannich)naphthol **30** unter sauren Bedingungen.

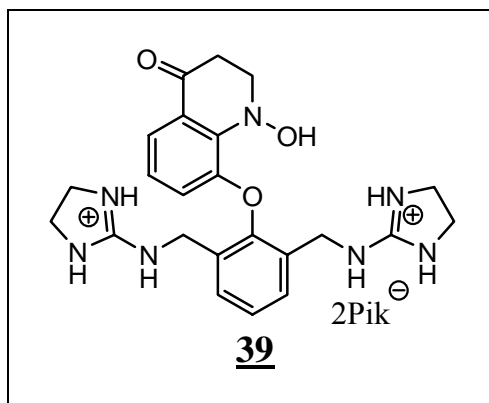
Wie Schema 2 zeigt, findet vermutlich im Säuren eine Eliminierung der Verbindung **30** statt. Dabei könnte es im ersten Schritt durch Protonierung der Mannichreste von Verbindung **30** zu einer Abspaltung des Dimethylamins kommen. Dabei würde das sehr reaktive Chinonmethid **31** entstehen, das sich wiederum sofort mit einem Nucleophil über die Verbindung **32** zu dem ebenfalls reaktiven Chinonmethid **33** umsetzen würde. Deswegen sind im Säuren für Verbindung **30** mehrere Reaktionsprodukte denkbar. Damit kann man sich die sehr niedrige Ausbeute von Bis(mannich)naphthol **34** erklären.

Um die Ausbeute zu steigern, wurde entschieden, die Mannichbasen auf der Stufe des Bis(guanidinium)naphthols **18** einzuführen.³¹ Denn man braucht keine TFA für die Reaktion. Die Umsetzung zu Bis(mannich)naphthol **34** wurde ebenfalls mit reversed phase HPLC verfolgt. Dabei konnte man feststellen, daß mit der Zeit hauptsächlich eine neue polarere Verbindung entstand. Dann wurde das Bis(mannich)naphthol **34** mit präparativer reversend phase HPLC gereinigt. Doch auch bei dieser Synthese war die Ausbeute gering. Der Grund dafür lag wiederum in der Säurelabilität der Mannichverbindungen (Schema 2), denn eine Trennung gelang nur im Säuren. Doch im Gegensatz zu der obigen Synthese kam hier das Bis(mannich)naphthol **34** nur bei der Trennung mit TFA in Kontakt. Damit war bei dieser Synthese die Ausbeute insgesamt höher.



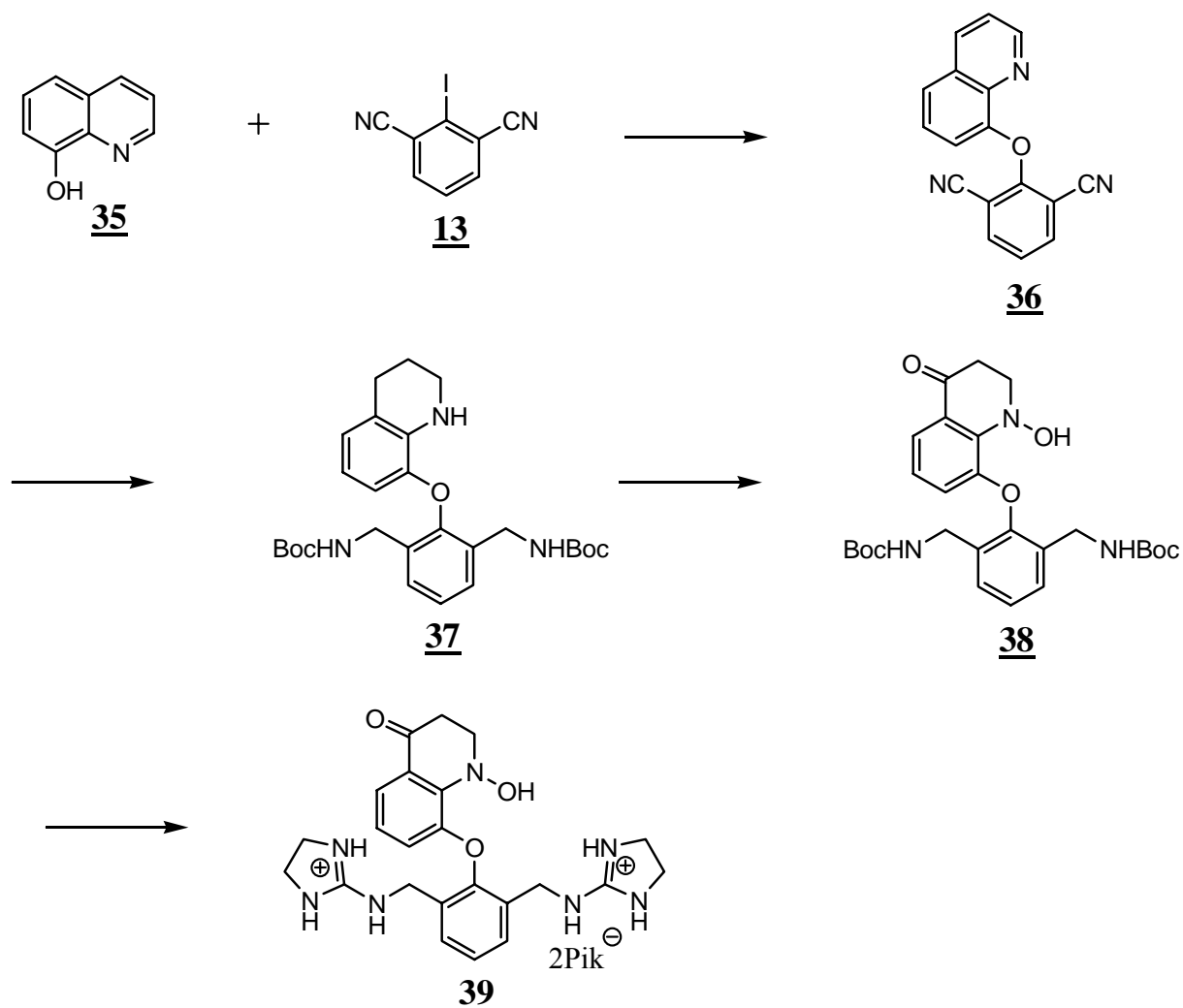
b) MeOH, N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, 60 °C, 13 %

4.1.6 Synthese von Bis(guanidinium)oxochinon **39**



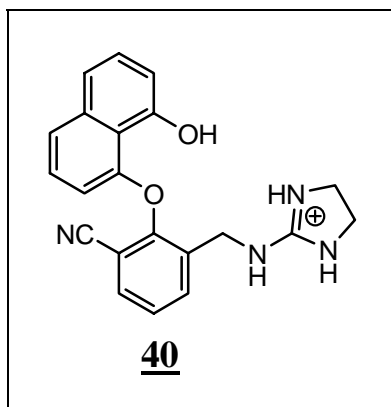
Da aus den Untersuchungen von Czarnik³² hervor ging, daß an Cyclodextrine gebundene Hydroxylamine besonders schnelle Umesterungsreaktionen eingehen können, wurde das Bis(guanidinium)oxochinon **39** synthetisiert. Dabei wurde die gleiche Synthesestrategie verwendet, wie bei Bis(guanidinium)naphthol **18**. Zuerst wurde die Verbindung **35** und Iodisophtalnitrit **13** mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 55% zu 8-Hydroxychinolin **36** gekuppelt. Anschließend wurde die Verbindung **36** durch Hydrierung und gleichzeitigem Schützen der entstandenen Amine mit Boc₂O in einer Druckapparatur zu Tertahydro-quinolin **37** umgesetzt. Im Gegensatz zu Verbindung **14**, wurde bei **36** auch der Heteroatomring hydriert. Durch Oxidation von Tertahydro-quinolin **37** konnte man dann das Oxochinon **39**

synthetisieren. Danach wurde **39** mit TFA/CH₂Cl₂ entschützt und mit Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zum Bis(guanidinium)oxochinon **39** umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ausfällung des Pikrat-Salzes.

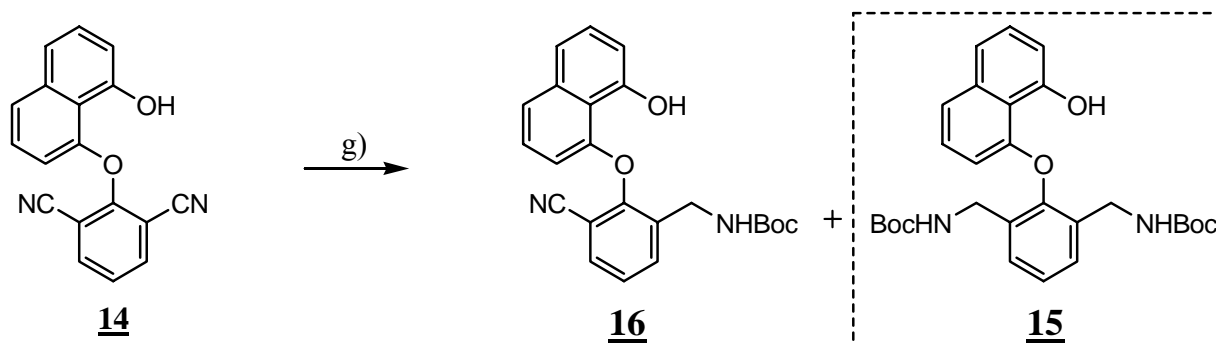


a) abs. DMF, NaH, 90 °C, 6 h, 55 % b) Boc₂O, Pd/C, abs. MeOH, 55 °C, 40 bar H₂-Druck, 42 h, 56 % c) abs. CH₃CN, NMO, TPAP, RT, 3 h, 60 % d) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h 2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 16 h 3. Pikrinsäure, 63 %

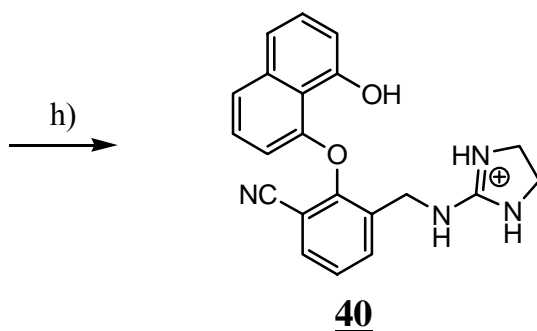
4.1.7 Synthese von Mono(guanidinium)naphthol 40



Da das Bis(guanidinium)naphthol 18 bis dahin die beste Reaktivität mit Modellphosphaten zeigte (Kapitel 5.1), wollte man den Einfluss eines Guanidiniumrestes auf die Reaktivität testen. Aus diesem Grund wurde das Mono(guanidinium)naphthol 40 synthetisiert. Deswegen musste zunächst gezielt das einfach geschützte Naphthol 16 (Kapitel 4.1.1) synthetisiert. Dabei wurde zur Hydrierung weniger H₂-Druck und kürzere Reaktionszeit verwendet, als bei der Synthese des zweifach geschützten Naphthols 15. Daraufhin wurde das einfach geschützte Naphthol 16 nach der üblichen Synthesevorschrift, in das gewünschte Mono(guanidinium)naphthol-Pikrat 40 umgesetzt.

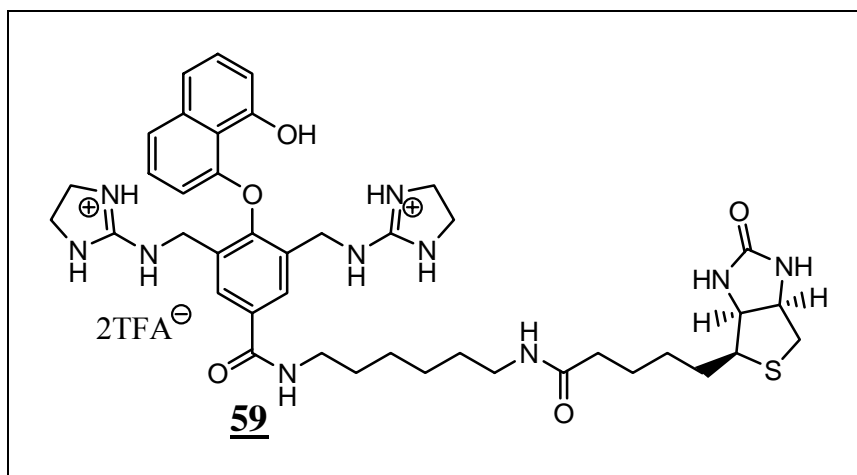


g) Boc₂O, Pd/C, abs. MeOH, 55 °C, 30 bar H₂-Druck, 42 h, 53 %



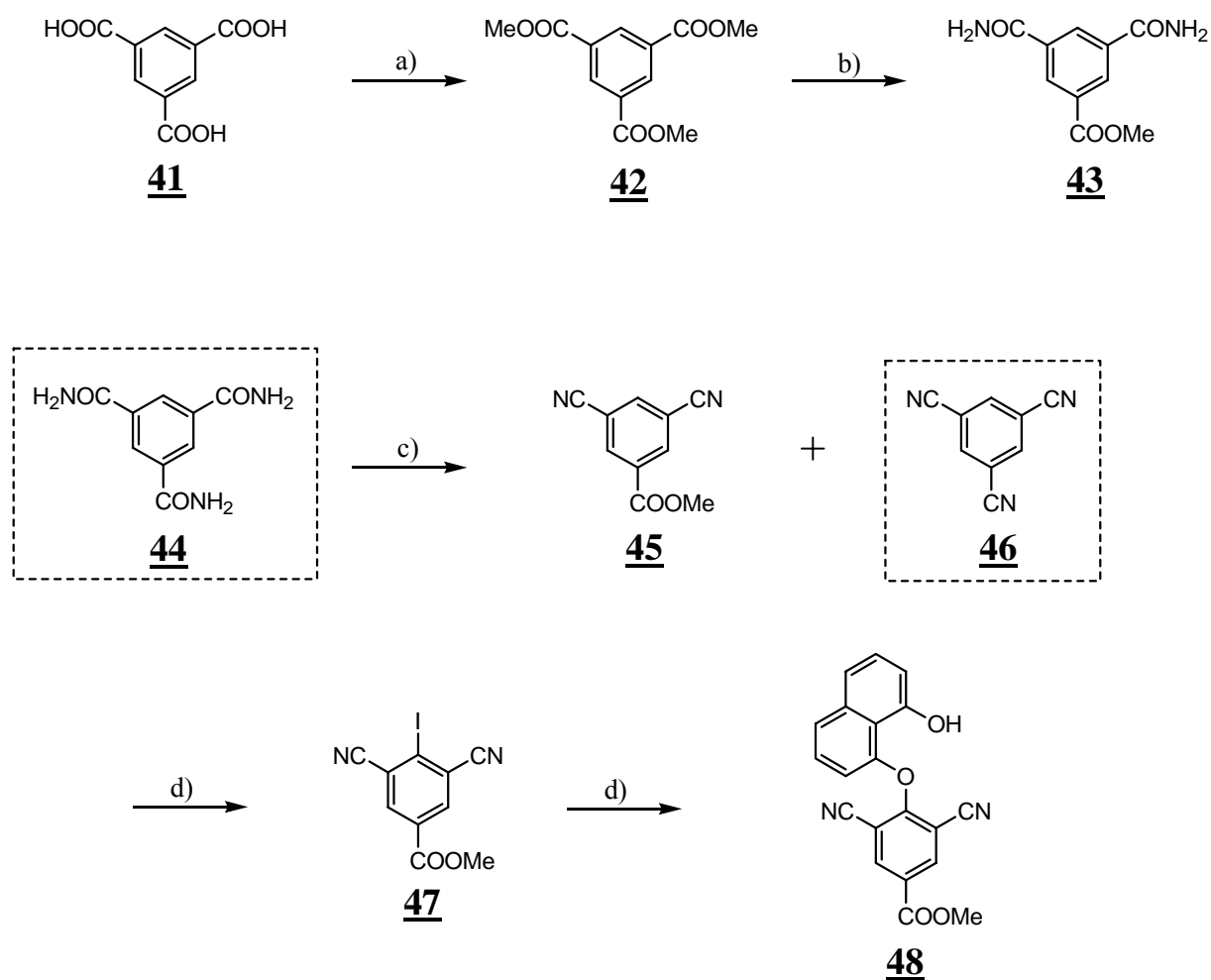
- h) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h
 2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h
 3. Pikrinsäure, 58 %

4.1.8 Synthese von biotینگelabeltem Bis(guanidinium)naphthol **59**



Die Tricarbonsäure **41** konnte mit einer guten Ausbeute über einen Säurechlorid in den Trimethylester **42** überführt werden.³³ Dieser konnte in einer Druckapparatur durch Aminolyse in den korrespondierenden Diamidester **43** überführt werden.³⁴ Als Nebenprodukt entstand das Triamid **44**. Dieses Reaktionsgemisch war in den üblichen Lösungsmitteln schwerlöslich. Aus diesem Grund wurde das Reaktionsgemisch ohne weitere Aufarbeitung

mit POCl_3 dehydratisiert. Dadurch war es möglich, den Dinitrilester **45** vom Trinitrilester **46** zu trennen. Der entscheidende Schritt der Synthese war jedoch die Iodierung des Dinitrilesters **47**. Dieser wurde zunächst nach einer Literatur bekannten Vorschrift iodiert.²⁷



a) SOCl_2 , 80 °C, 2 h, MeOH, 88 % b) kond. NH_3 , 60 °C, 6 h, 75 % c) abs. Pyridin, 3 °C, POCl_3 , 15 min RT, 10 min 80 °C, 78 % d) abs. THF, -78 °C, LDA, I_2 , 3 h, 11 % e) abs. DMF, **11**, NaH, 30 min, 82 %

Doch die Iodierung funktioniert nicht so gut, wie die der Dinitrilverbindung **12**. Der Grund dafür lag vermutlich in der höheren Reaktivität des Dinitrilesters **45** gegenüber der Dinitrilverbindung **12**.

Tabelle 2: Iodierung von **45** mit verschiedenen Basen, bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen Iodierungsmitteln (— = Reaktion nicht durchgeführt).

	45 , I ₂ , -90 °C, Ausbeute	45 , I ₂ , RT, Ausbeute	45 , ICl, RT Ausbeute	45 , Cl ₄ , -90 °C, Ausbeute
LDA	11%	5%	0%	7%
LiHMDS	0%	0%	—	—
n-BuLi	0%	—	—	—
sec-BuLi	4%	—	—	—
t-BuLi	6%	—	—	—
MeLi	8%	—	—	—
NaH	0%	0%	—	—
K ₂ CO ₃	—	—	0%	—
TMPZnBu ₂ Li ³⁵	—	0%	—	—

Wie Tabelle 2 zeigt, konnte auch unter anderen Reaktionsbedingungen keine Verbesserung der Ausbeute bei der Iodierung von Dinitrilestern **45** erreicht werden. Doch dafür funktionierte die Kupplung von Iodmethylester **47** mit dem Diol **11** zum Methylester **48** mit einer Ausbeute von 82 %. Diese Kupplung funktionierte besser, als die zu Verbindung **14**. Trotzdem wurde versucht, über eine andere Synthesestrategie zum Methylester **48** zuzugreifen.

4.1.8.1 Geplante Synthese von Methylester 48

Man wollte auf der Stufe des Trimethylesters 42 das Iodatom einzuführen, um dann über die unten gezeigte Synthese zum Methylester 48 zu gelangen.

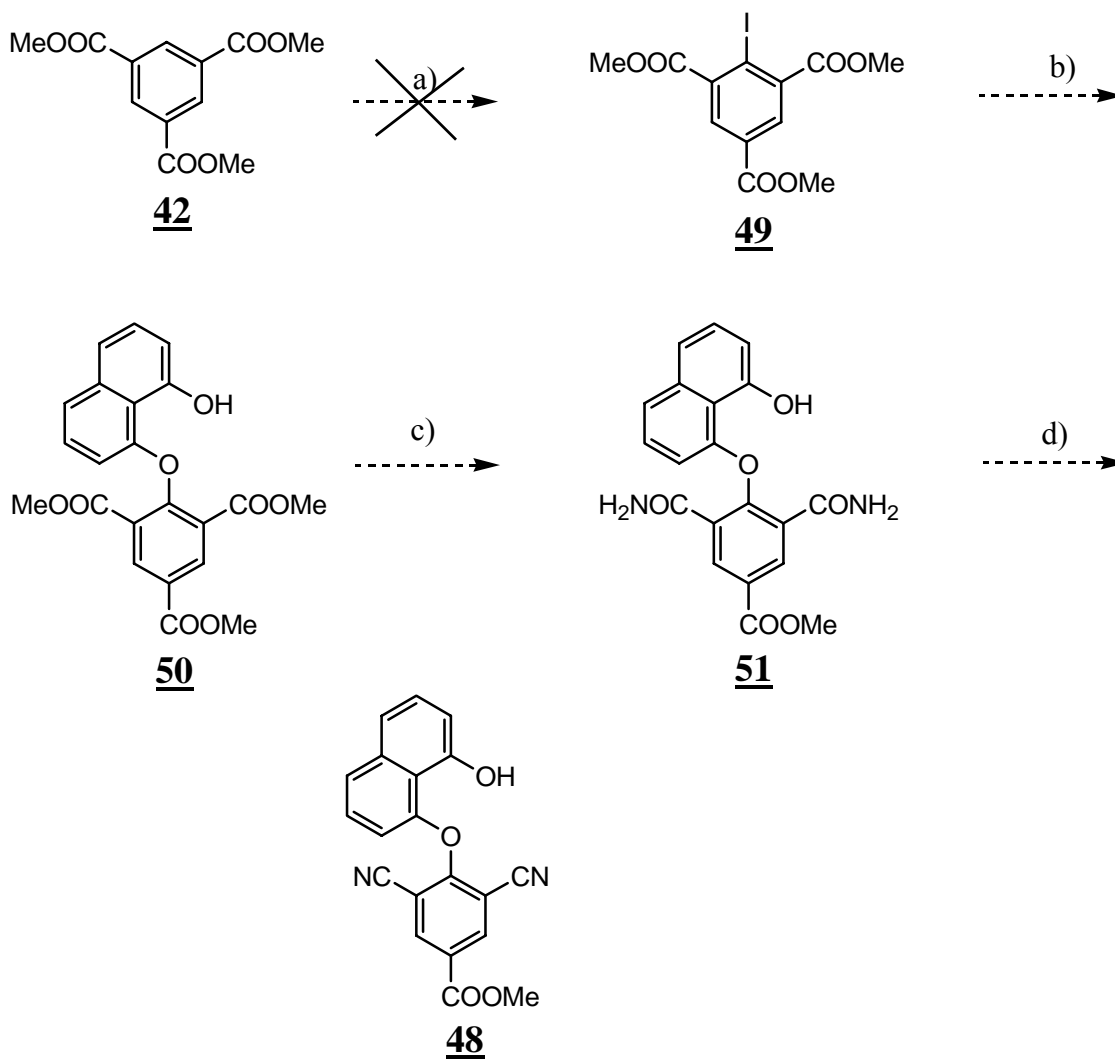
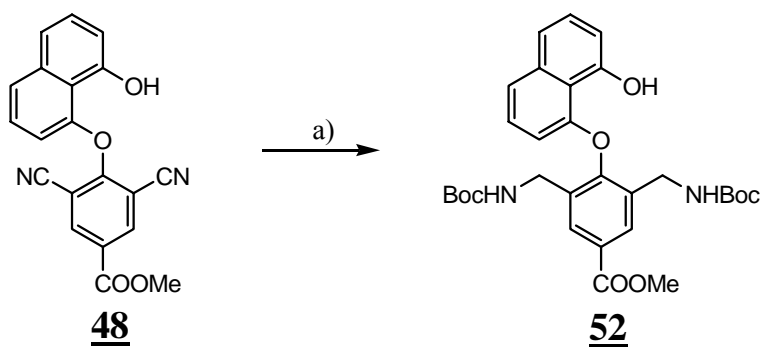


Tabelle 3: Iodierung von **42** mit verschiedenen Basen, bei verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen Iodierungsmitteln.

	42 , -90 °C, I ₂ Ausbeute	42 , RT, I ₂ Ausbeute	42 , 90 °C, I ₂ Ausbeute
LDA	0%	0%	0%
NaH	0%	0%	0%

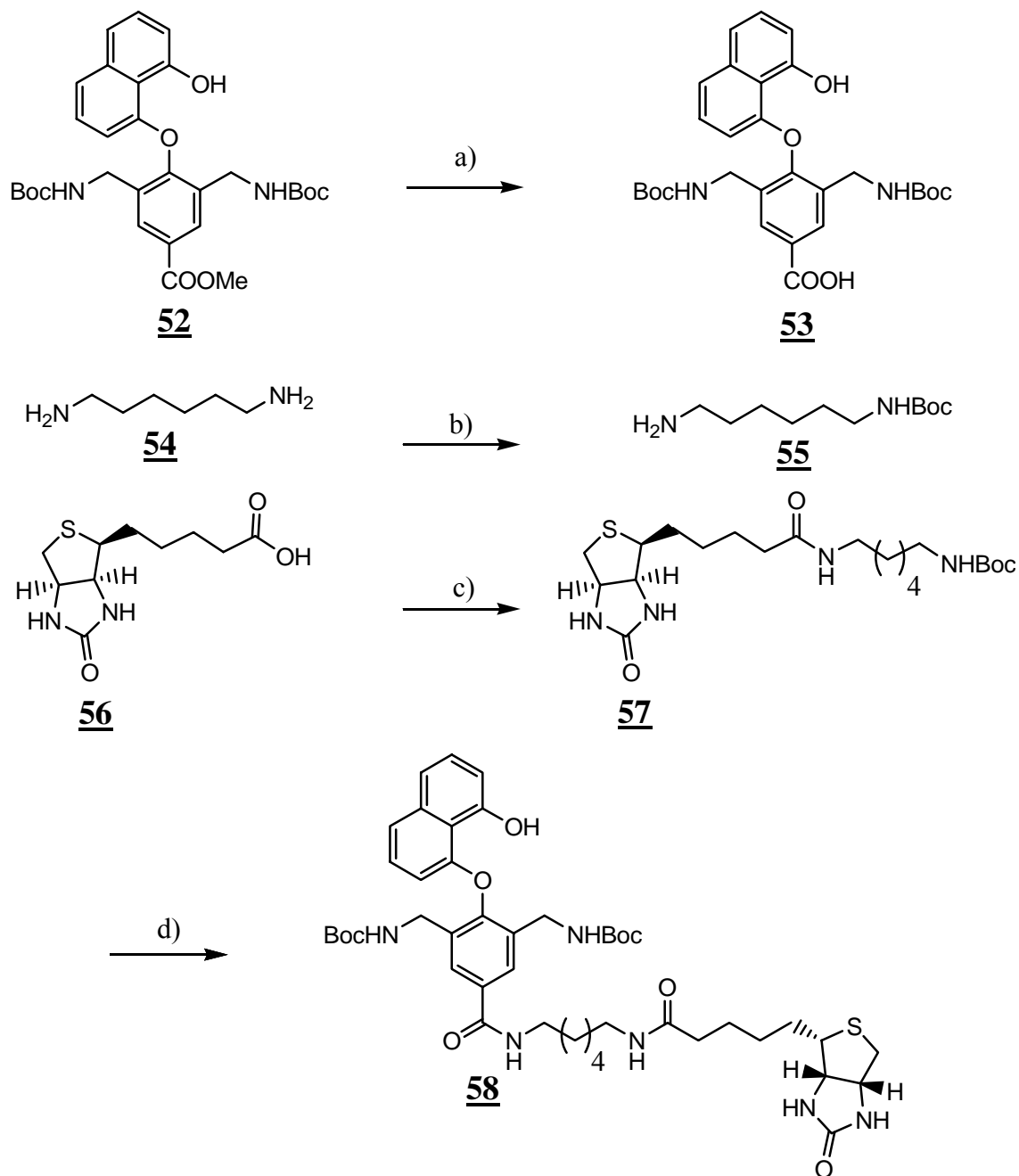
Doch wie die Tabelle 3 zeigt, konnte auf diesen Weg die Verbindung **42** nicht iodiert werden. Aus diesem Grund wurde mit der Synthese zum Methylester **48** auf diesem Weg abgebrochen und sich für die Iodierung nach der bekannten Vorschrift des Dinitrilesters **45** entschieden (4.1.7).²⁷ Die restlichen Syntheseschritte bis zum biotینگelabelten Bis(guanidinium)naphthol **59** funktionierten in guten Ausbeuten. Die Hydrierung zum zweifach geschützten Methylester **52** war mit der Hydrierung von Verbindung **15** vergleichbar.



a) abs. MeOH, Pd/C, PtO₂, 40 bar H₂-Druck, 55 °C, 16 h, 71 %

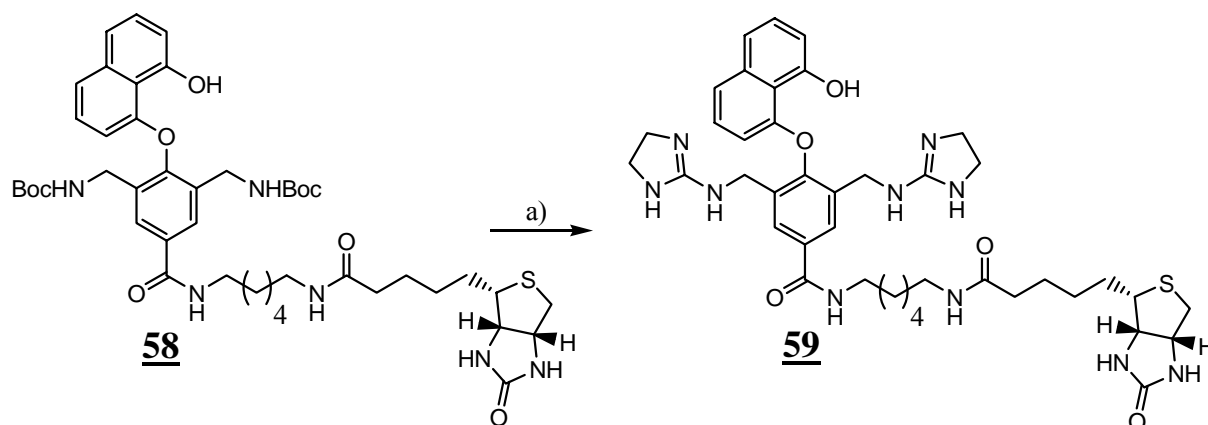
Dann wurde das Diaminohexan **54** mit mäßiger Ausbeute mono-geschützt und mit Biotin **56** gekuppelt.³ Danach wurde das Reaktionsgemisch auf salzsaures Eiswasser gegossen, mit EtOAc ausgeschüttelt, die organische Phase einrotiert und der erhaltene Feststoff säulenchromatographisch gereinigt. Doch es gelang nicht, die Biotinverbindung **57** völlig von HOBt und Diisopropylcarbodiimidharnstoff zu befreien. Anschließend wurde die Schutzgruppe der Biotinverbindung **57** abgespalten und mit Verbindung **53** umgesetzt.³⁷ Die Verbindung **53** wurde zuvor durch Hydrolyse aus dem zweifach geschützten Methylester **52**

synthetisiert. Die Verbindung **58** wurde genau so isoliert, wie die Biotinverbindung **57**. Auch diese Verbindung war mit HOBt und Diisopropylcarbodiimidharnstoff kontaminiert.



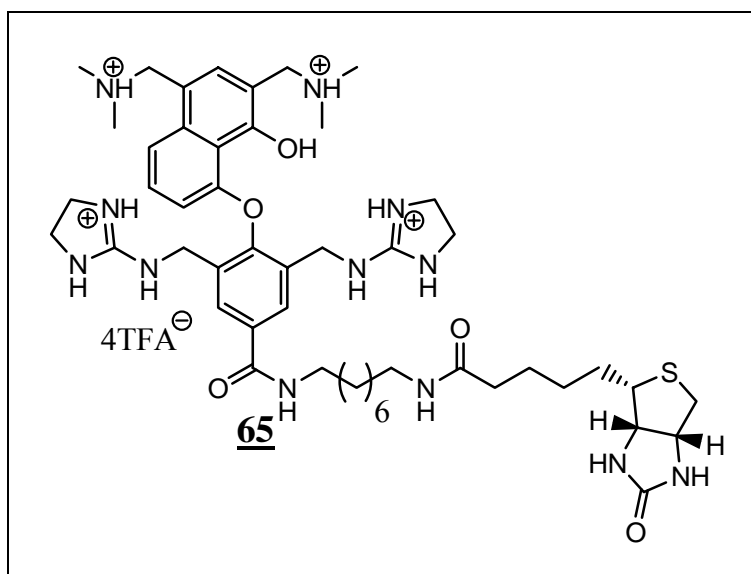
a) MeOH/H₂O (3:1), LiOH-mono-hydrat, 60 °C, 1 h, 99 %
b) EtOAc, 40 min, Boc₂O, 45 % c) abs. DMF, **55**, HOBt, DIC, 42 °C, 18 h, 61 % d) abs. DMF, HOBt, DIC, **53**, 60 °C, 2 h

Anschließend wurden die Schutzgruppen der biotینگelabelten Verbindung **57** abgespalten und nach der bekannten Vorschrift mit Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** umgesetzt.⁷ Die Reinigung des Bis(guanidinium)naphthols **59** gelang durch Aufarbeitung des Reaktionsgemisches mit CH₂Cl₂/NaOH. Es war keine weitere Trennung mit der präparativen reversed phase HPLC notwendig.



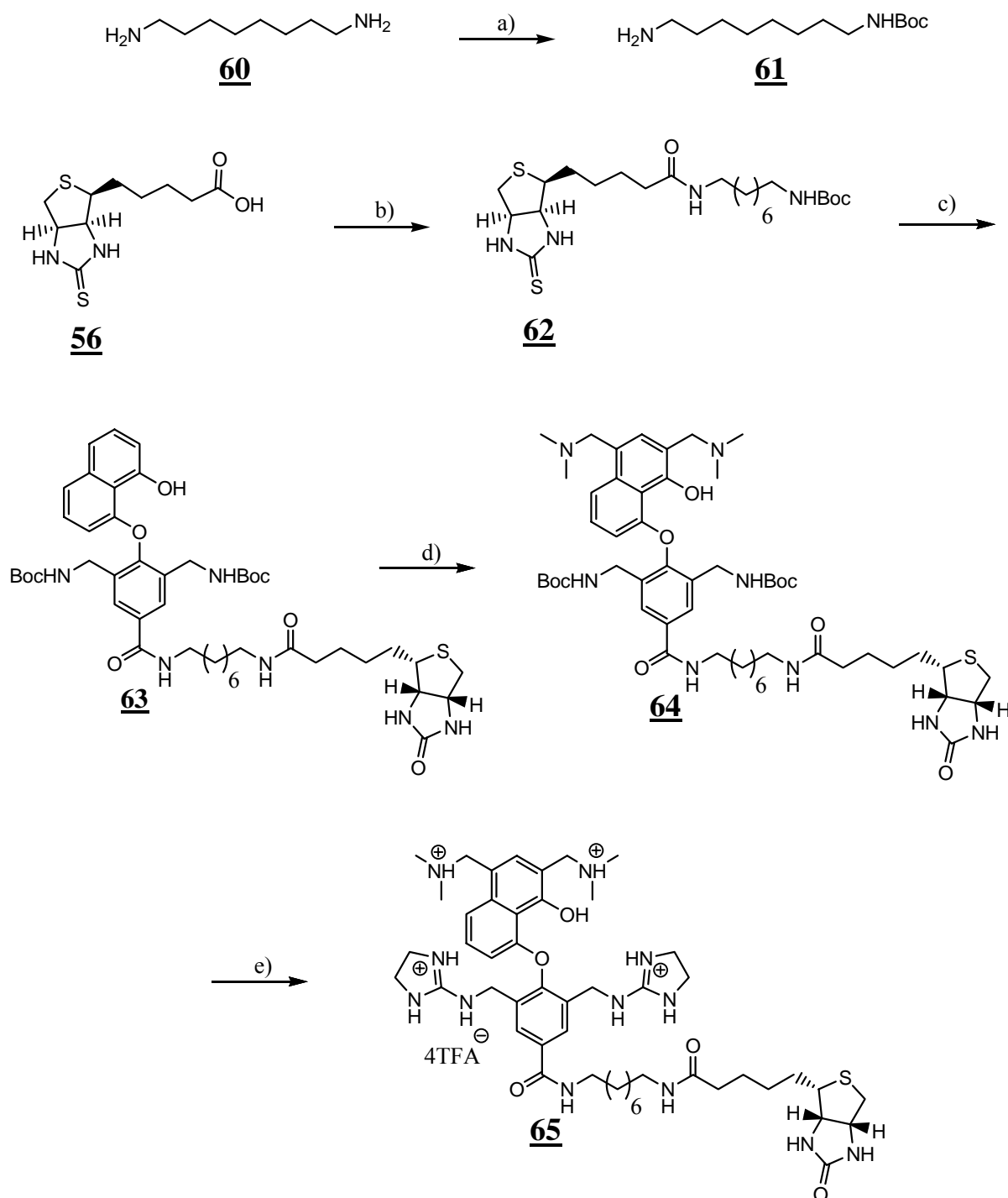
a) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h 2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, 41 %

4.1.9 Synthese von biotینگelabeltem Bis(mannich)naphthol **65**



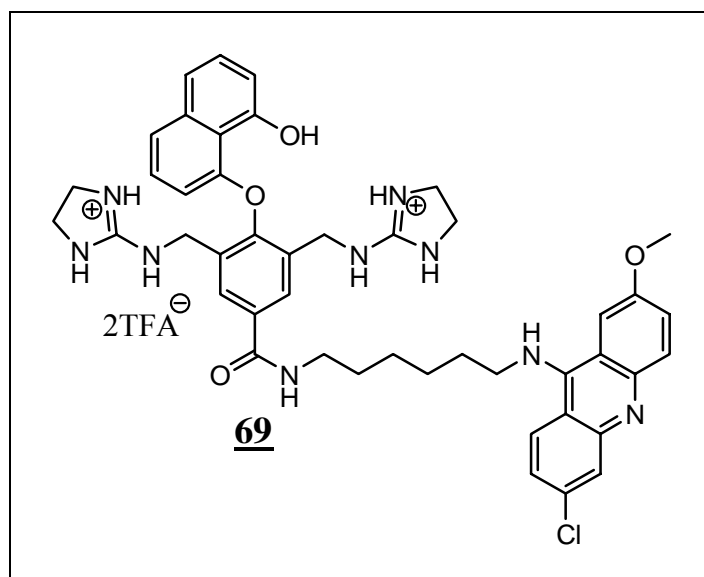
Die Syntheseroute des biotینگelabelten Bis(mannich)naphthols **65** war mit der des biotینگelaben Bis(guanidinium)naphthols **59** fast identisch. Der Unterschied bestand lediglich darin, das erstens der Linker von **65** um zwei C-Einheiten länger war als das Bis(guanidinium)naphthol **59** und zweitens ein zusätzlicher Schritt nötig war, um die Mannichbasen einzuführen. Doch der große Vorteil bei dieser Synthese lag darin, daß man sowohl die Biotinverbindung **62**, als auch die biotینگelabelte Verbindung **63** von HOBt und Diisopropylcarbodiimidharnstoff befreien konnte. Denn beim Gießen der Reaktionsgemische auf salzsaures Eiswasser fielen die Produkte elementaranalysenrein aus. Die Mannichbasen wurden auf der Stufe der zweifach geschützten Biotinverbindung **63** eingeführt. Dieser Schritt war mit dem von Bis(mannich)verbindung **30** (Kapitel 4.1.5) identisch und man erhielt mit einer guten Ausbeute die Mannichverbindung **64**. Diese wurde dann mit TFA entschützt und gleichzeitig wurde die Reaktion mittels reversed phase HPLC verfolgt. Dabei entstanden mehrere Verbindungen. Als kein Edukt mehr vorhanden war, wurde die Probe mit Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zum biotینگelabelten Bis(mannich)naphthol **65** umgesetzt. Dieses wurde dann mit der präoperativen reversed phase HPLC gereinigt. Da sowohl hier als auch bei der Entschützung von Mannichverbindung **64** TFA verwendet wurde und die Mannichverbindungen säurelabil sind (Schema 2), erhielt man das biotینگelabete Bis(mannich)naphthol **65** mit einer schlechten Ausbeute. Aus diesem

Grund wäre es von Vorteil, die Mannichbasen auf der letzten Stufe einzuführen. Denn dann würden die Mannichreste in der Synthese nur einmal mit TFA behandelt.

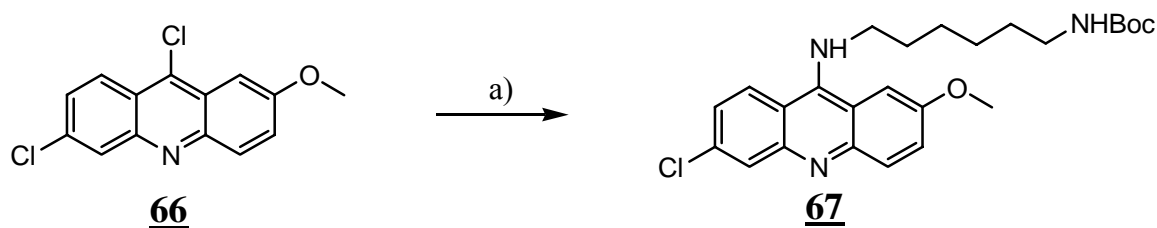


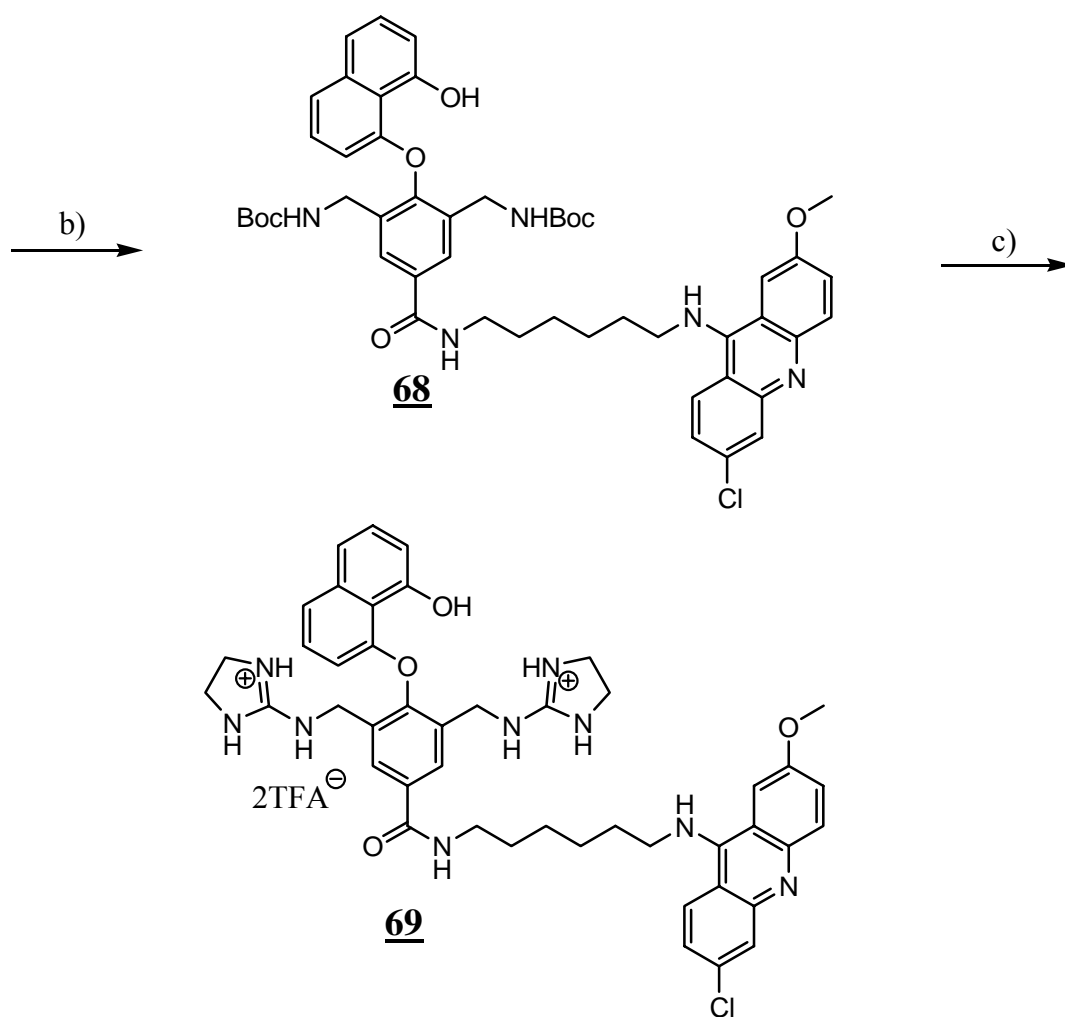
a) abs. THF, 3 °C, Boc₂O, RT, 30 min, 43 % b) abs. DMF, **61**, HOBT, DIC, 60 °C, 3 h, 70 % c) abs. DMF, HOBT, DIC, **53**, 60 °C, 45 min, 83 % d) abs. MeOH, 60 °C, N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, 66 % e) 1. TFA/CH₂Cl₂ 2. MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, 27 %

4.1.10 Synthese von acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol **69**



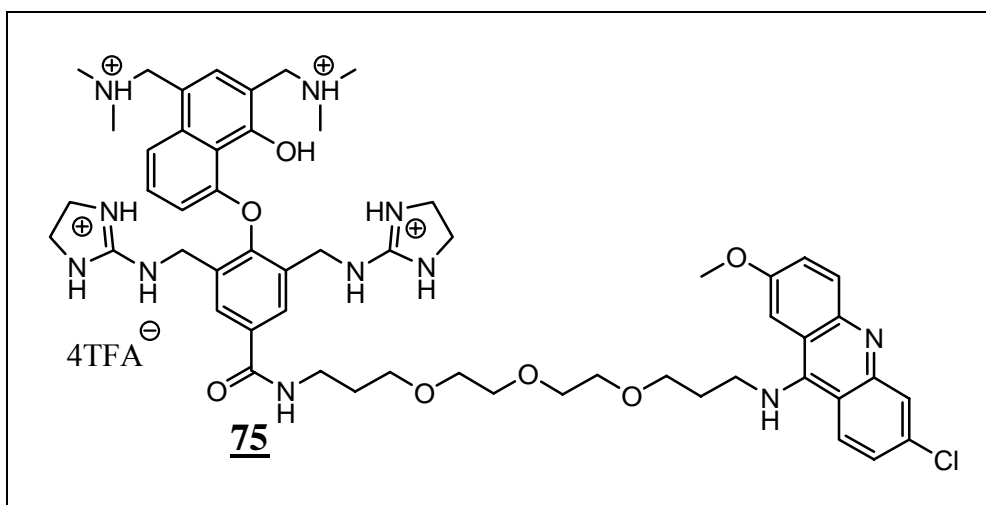
Die Synthese des acridingelabelten Bis(guanidinium)naphthols **69** verlief analog zu der Synthese von biotingelabeltem Bis(guanidinium)naphthols **59**. Bei dieser Synthese wurde statt eines Biotinrestes ein Acridin über einem Linker an der zweifach geschützten Naphtholverbindung **53** gekuppelt. Die einzige neue Reaktion war die Synthese der Acridinverbindung **67**.²² Die Reaktion wurde nach einer bekannten Vorschrift mit mäßigen Ausbeuten durchgeführt. Danach wurde die Acridinverbindung **67** mit TFA entschützt und mit der Verbindung **53** zu acridingelabelten Verbindung **68** umgesetzt. Aus der Verbindung **68** wiederum wurde mit dem Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** das acridingelabelte Bis(guanidinium)naphthol **69** erhalten. Dieses wurde dann mit der präoperativen reversed phase HPLC gereinigt. Der Vorteil der Synthese aus Kapitel 4.1.7 zeigte sich hier. Durch kleine Änderung in dieser Synthese gelangt man zu einer völlig neuen Verbindung.



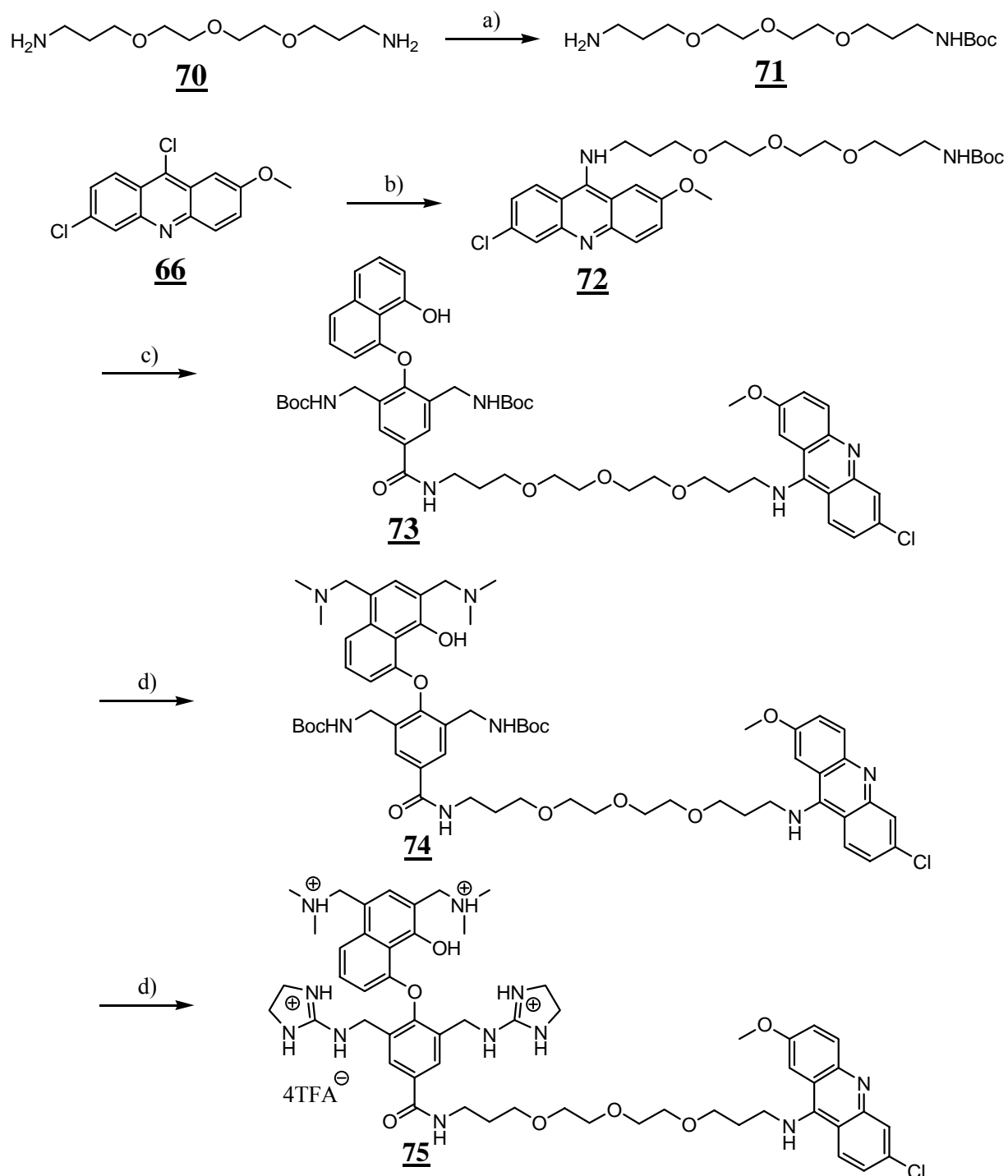


a) abs. DMF, Phenol, Rückfluss, 1 h, 51 %, b) abs. DMF, **53**, DIC, HOBt, Rückfluss, 20 min, 78 % c) MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, 25 %

4.1.11 Synthese des acridingelabelten Bis(mannich)naphthols 75

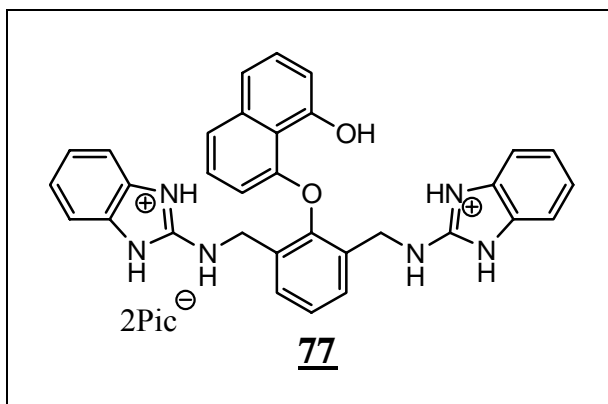


Die Synthese des acridingelabelten Bis(mannich)naphthols 75 ist analog zu der Synthese von biotingelabeltem Bis(mannich)naphthol 65. Hier wurde statt Biotin der Acridinlinker 72 verwendet. Die Synthese dieses Acridinlinkers 72 konnte nach der literaturbekannten Vorschrift realisiert werden.³⁶ Danach wurde die Verbindung 72 mit TFA entschützt und mit der Verbindung 53 über die acridingelabelte Verbindung 73, zu der Mannichverbindung 74 umgesetzt. Anschließend wurden die Schutzgruppen von 74 mit TFA abgespalten und daraus dann mit dem Dihydroimidazoliumsulfonsäure 17 das acridingelabelte Bis(mannich)naphthol 75 erhalten. Dieses wurde dann mit der präoperativen reversed phase HPLC gereinigt

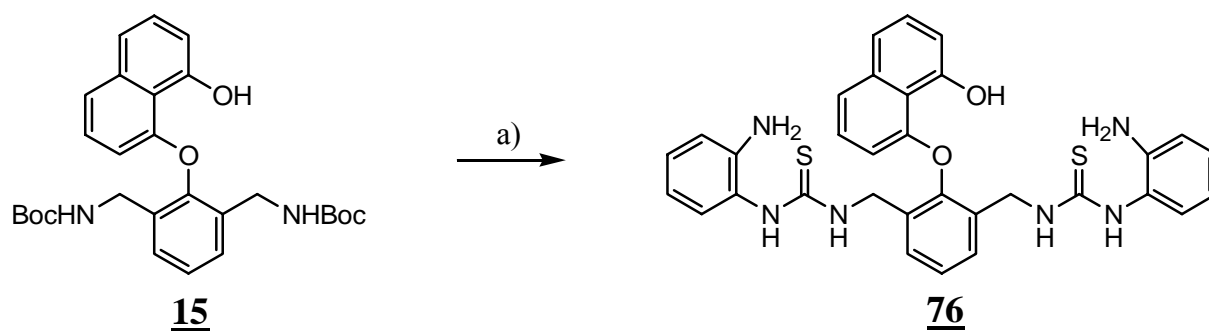


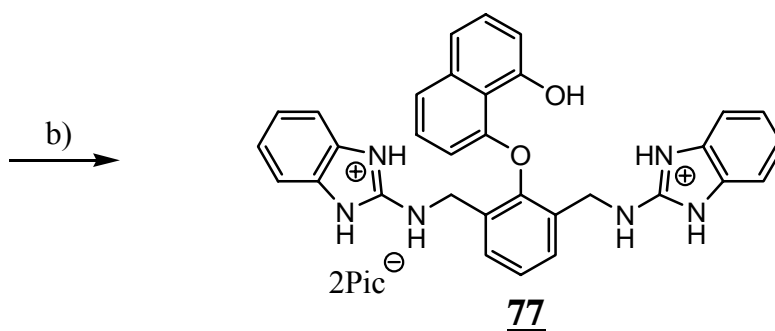
a) abs. THF, 3 °C, Boc-ON, 1 h, 41 %, b) abs. DMF, Phenol, **71**, Rückfluss, 24 h, 67 %, c) abs. DMF, **53**, DIC, HOBT, 60 °C, 2 h, 63 % d) CH₃CN, N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, 60 °C, 38 % e) CH₂Cl₂, TFA, 3 h, MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, 59 %

4.1.12 Synthese von Bis(benzimidazol)-naphthol 77



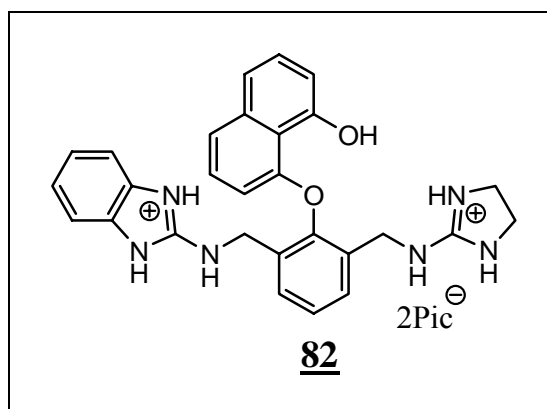
Zunächst wurden die Schutzgruppen der zweifach geschützten Naphtholverbindung 15 mit TFA abgespalten und dann die freie Verbindung nach einer bekannten Vorschrift mit einer guten Ausbeute, zum der Thionharnstoff 76 umgesetzt.³⁷ Anschließend wurde diese Verbindung mit HgO zum Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit einer guten Ausbeute cyclisiert. Wichtig hierbei war es, daß man das HgO portionsweise langsam zugegeben musste. Denn wenn das HgO auf einmal zugegeben wurde, war die Ausbeute trotz länger Reaktionsdauer auch schlechter.





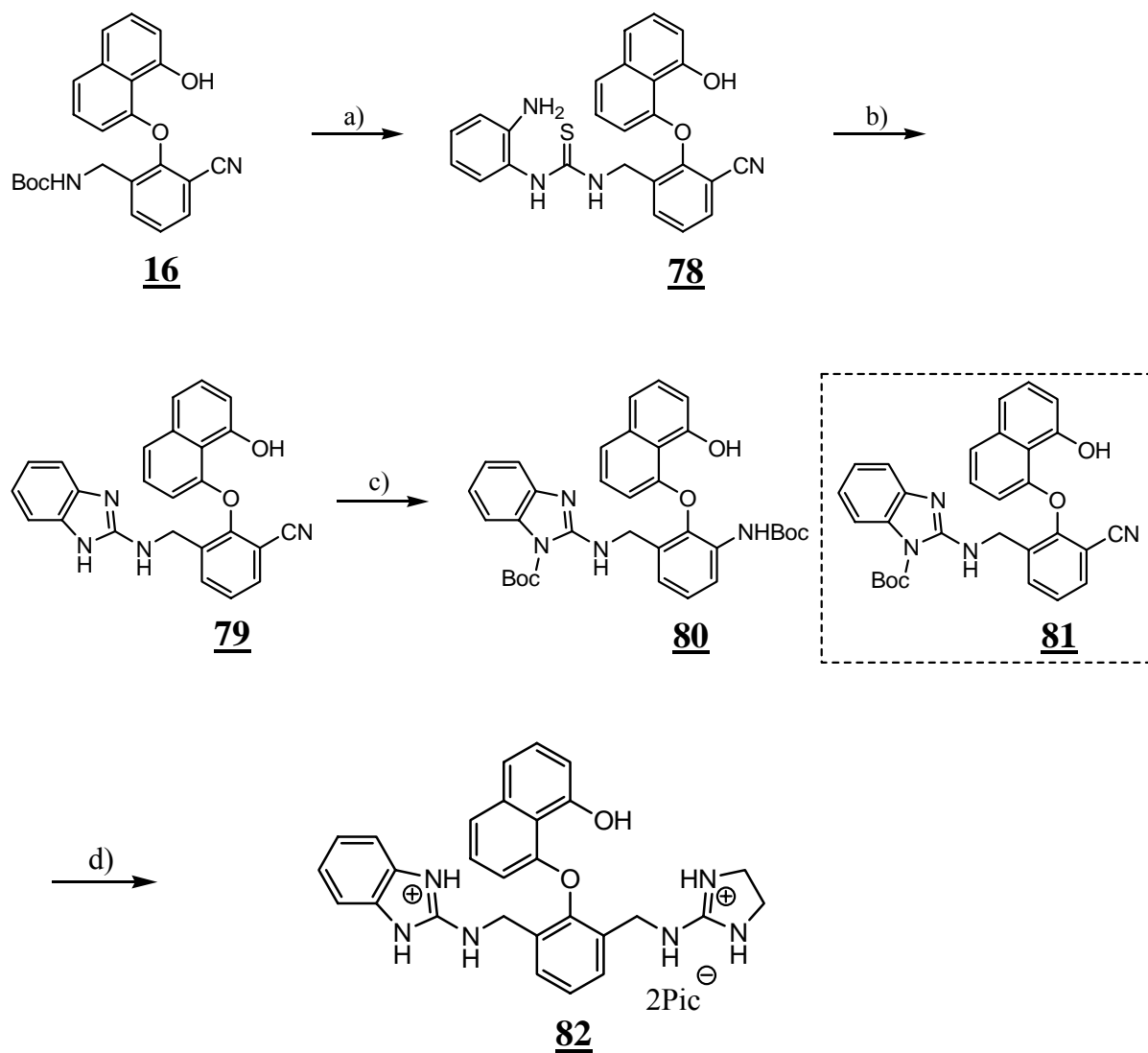
a) CH₂Cl₂, TFA, 3 h, EtOH, 3 °C, dann Imidazol, 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol, RT, 4h, dann 1,2-Phenylendiamin, 12 h, 60 % b) MeOH, HgO/S, 3 h, Pikrinsäure, 77 %

4.1.13 Synthese von Benzimidazol-guanidinium-naphthol **82**



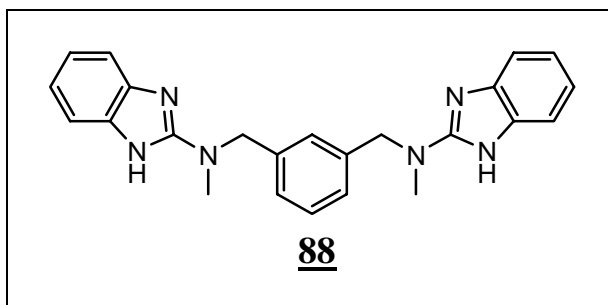
Die Synthese des Benzimidazolguanidiniumnaphtholes **82** war ähnlich der Synthese von Bis(benzimidazol)naphthol **77** und Bis(guanidinium)naphthol **18**. Zunächst wurde der Benzimidazolrest an die einfach geschützte Naphtholverbindung **16** gekuppelt. Dann wurde der Guanidiniumrest an das Monobenzimidazol **79** gekuppelt. Nur bei der Hydrierung von **79** gab es Probleme. Denn zunächst wurde nicht die Nitrilgruppe hydriert, sondern nur der Benzimidazolrest von Monobenzimidazol **79** N-geschützt und dann erst die Nitrilgruppe hydriert. Doch die Ausbeute von hydrierten Verbindung **80** war nicht zufriedenstellend, da

noch Verbindung **81** vorhanden war. Doch durch längere Reaktionszeiten und höhere H₂-Drücke sollte es möglich sein, ausschließlich die Verbindung **80** zu synthetisieren.

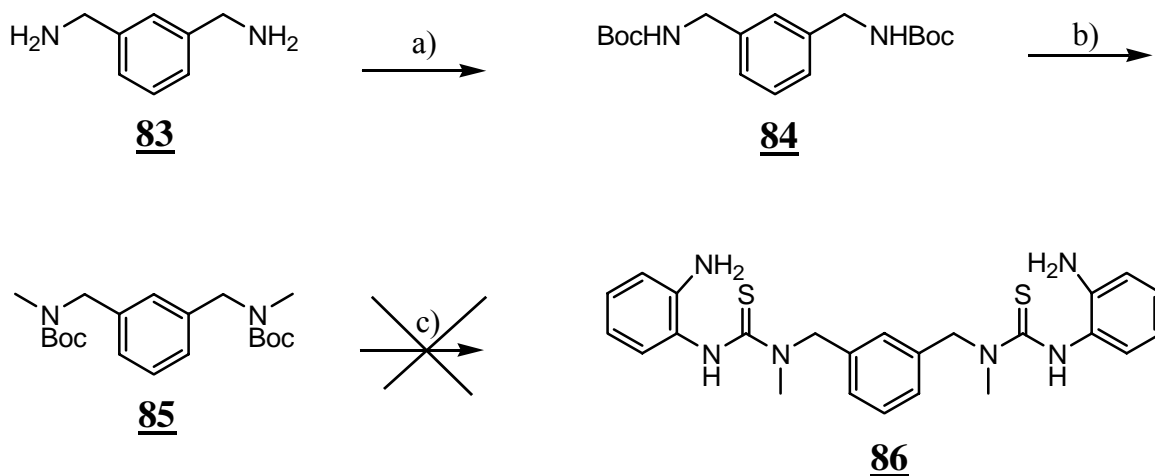


- a) CH₂Cl₂, TFA, 3 h, EtOH, 3 °C, dann Imidazol, 1,1 -Thiocarbonyldiimidazol, RT, 4 h, dann 1,2-Phenylendiamin, 12 h, 53 % b) MeOH, HgO/S, 3 h, 81 %
 c) abs. MeOH, Pd/C, PtO₂, Boc₂O, 40 bar H₂-Druck, 55 °C, 12 h, 20 %
 d) MeOH, H₂O, NEt₃ (1:1:1), Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, 24 h, dann Pikrinsäure, 60 %

4.1.14 Synthese von N-methyliertem Bisbenzimidazol 88

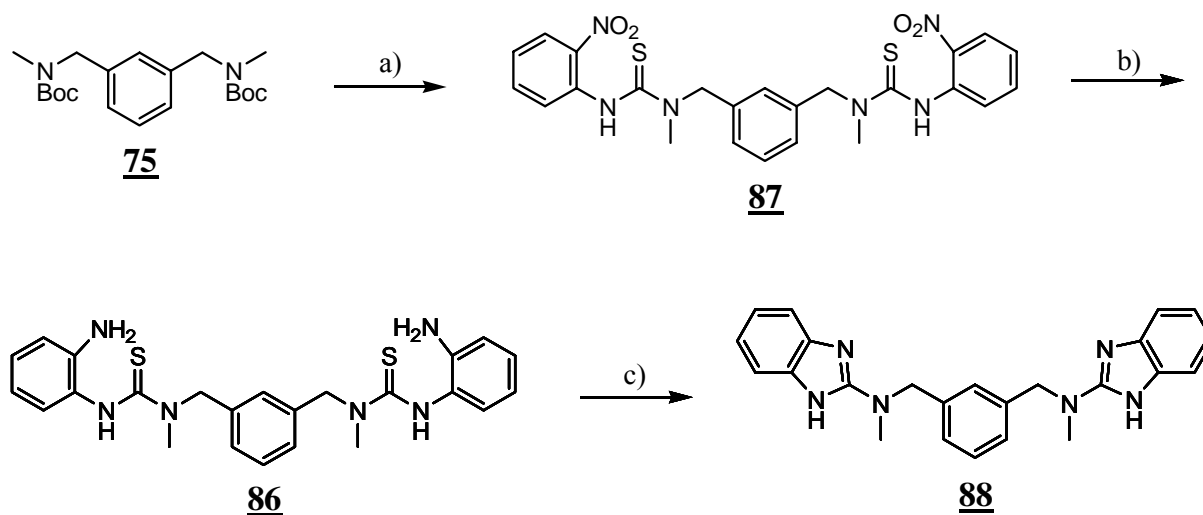


Das Diaminobenzol **83** wurde zuerst in sehr guten Ausbeute geschützt und in ebenfalls guter Ausbeute zu der N-methylierten Verbindung **85** umgesetzt. Die Umsetzung zu der Diaminoverbindung **86** funktionierte unter Standardbedingung nicht.³⁷ Es konnte weder bei RT noch bei 90°C die gewünschte Diaminoverbindung **86** isoliert werden. Aus diesem Grund wurde die N-methylierte Verbindung **85** zu der Thioharnstoffverbindung **87** umgesetzt.



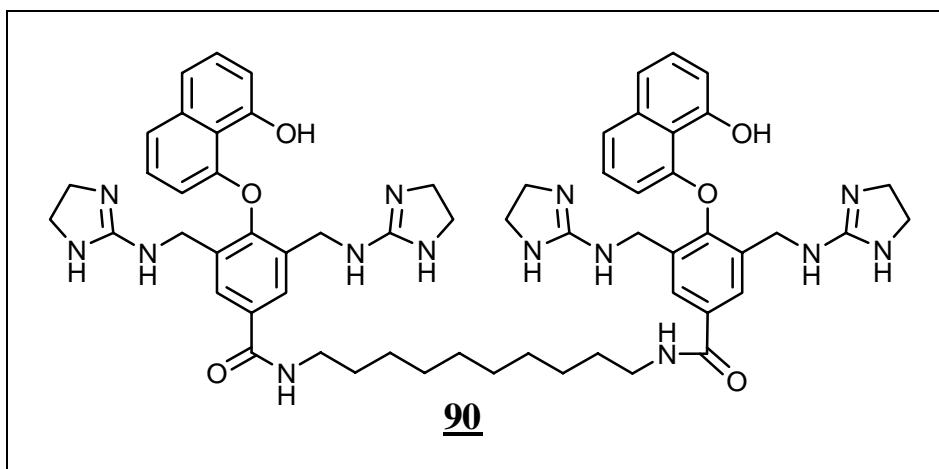
a) abs. THF, Boc_2O , 3 °C, 4 h, 100% b) abs. THF, n-BuLi, MeI, 3 °C, 13 h, 99 %
c) CH_2Cl_2 , TFA, RT, 2 h, abs. CH_3CN , dann Imidazol, 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol, dann 1,2-Phenylendiamin, RT, 12 h, 0 %

Die Umsetzung zu der Thioharnstoffverbindung **87** funktionierte unkompliziert, denn bei der Reaktion fiel **87** analysenrein aus der Lösung aus. Diese wurde dann nach der literaturbekannten Vorschrift mit SnCl_2 reduziert.³⁸ Doch die gewünschte Diaminoverbindung **86** konnte nicht von den Sn-Salzen befreit werden. Die Verbindung **87** wurde auch mit Samarium reduziert.³⁹ Aber auch hier konnte **86** nicht von den Salzen befreit werden. Aus diesem Grund wurde schließlich die Thioharnstoffverbindung **87** in einer Druckapparatur mit H_2 und Pd/C reduziert. Nur ein kleiner Teil hat sich zum gewünschten **86** umgesetzt. Bei dem Rest handelt es sich um Edukt **87**. Zuletzt wurde **86** mit HgO nach der literaturbekannten Vorschrift zu dem Bisbenzimidazol **88** cyclisiert.³⁷

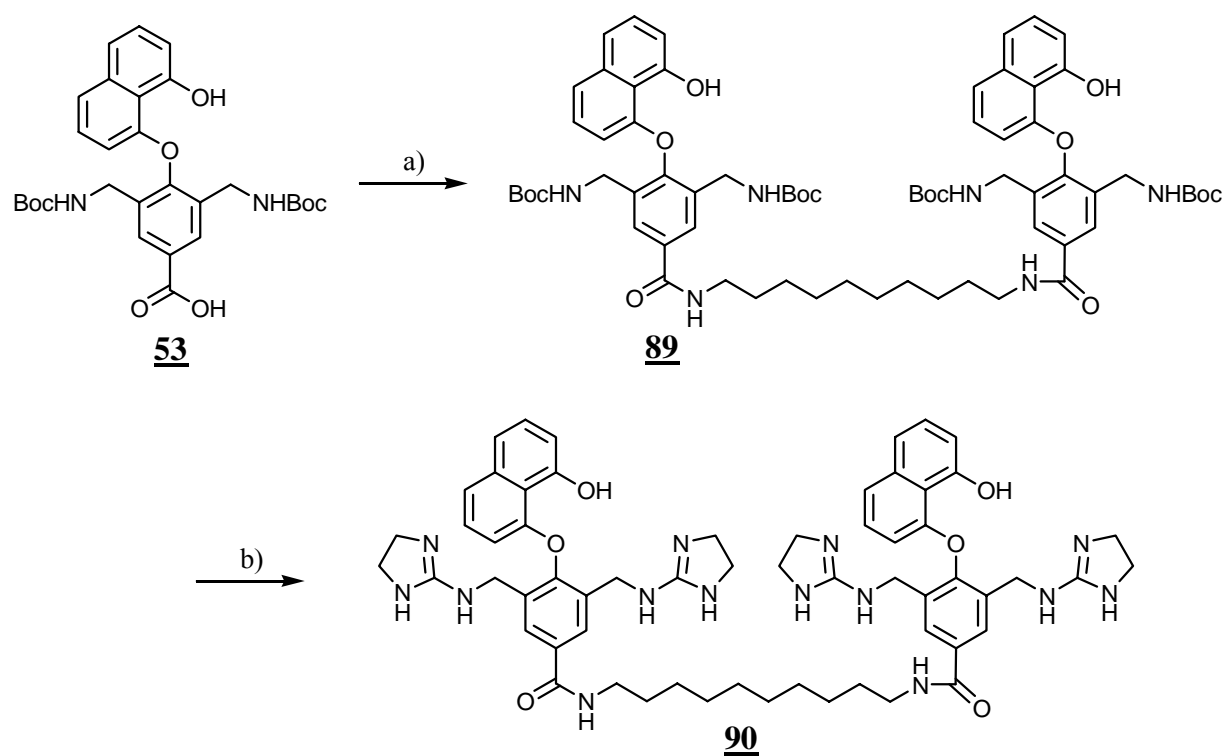


a) CH_2Cl_2 , TFA, RT, 2 h, abs. MeOH, 2-Nitrophenylisothiocyanat, RT, dann 2 h, 49 %. b) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1 1 % NH_3), Pd/C, 40 °C, 16 h, 10 % c) abs. MeOH, HgO/ S, Rückfluss, 3 h, 40 %

4.1.15 Synthese von Di-bis(guanidinium)naphthol 90



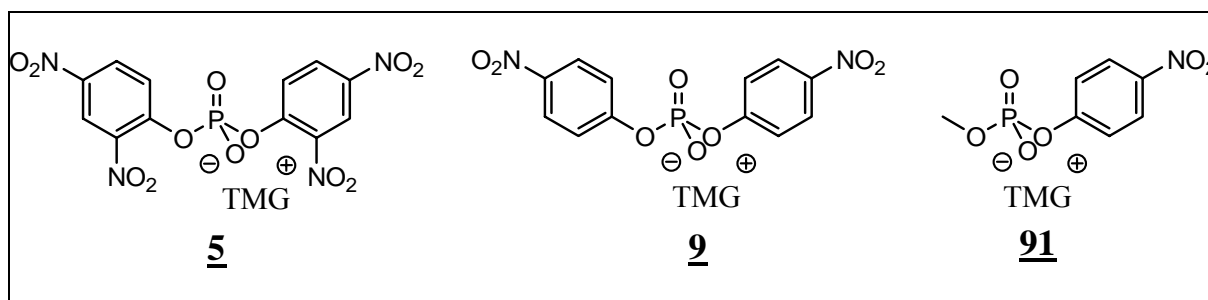
Der Vorteil der Synthese von biotینگelabeltem Bis(guanidinium)naphthol **45** (Kapitel 4.1.7) zeigte sich wieder bei dieser Synthese. Ohne die Synthesestrategie zu ändern, konnte man zwar mit schlechter Ausbeute, aber sehr schnell und erfolgreich das gewünschte Bis(guanidinium)naphthol **90** synthetisieren.³⁶ Denn beim ersten Schritt fiel das zweifach geschützte Naphthol **89** bei der Zugabe von HCl-saurem Eiswasser aus. Beim zweiten Schritt konnte man das Bis(guanidinium)naphthol **90** aus der organischen Phase im Basischen isolieren (Kapitel 4.1.1).



a) abs. DMF, HOBt, DIC, 1,2-Diaminodecan, 60 °C ,
2 h, 33 % b) 1. TFA, CH₂Cl₂, 3 h 2. MeOH, H₂O,
NEt₃ (1:1:1), RT, Dihydroimidazolium-sulfonsäure **17**,
24 h, 18 %

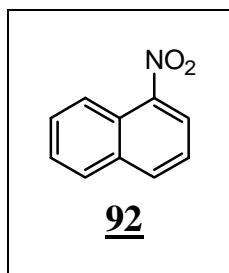
5 Kinetiken der biskationischen Naphthole mit aktivierten Phosphorsäuredieestern

Die Reaktivitäten der kationischen Naphthole in dieser Arbeit wurden mit folgenden Substraten getestet:⁶



Zunächst wurde die Phosphorylierung der synthetisierten kationischen Naphthole mit dem am reaktivsten Modells substrat 2,4-BDNPP **5** gemessen. Wenn die Geschwindigkeit hoch genug war, wurden sie dann mit dem weniger reaktiven 4-BNPP **9** getestet. Wenn die Reaktivität auch gegenüber 4-BNPP **9** noch hoch genug war, wurden sie zuletzt mit dem am wenigsten reaktiven 4-MNPP **91** gemessen. Anschließend wurden mit den aktivsten kationischen Naphtholen die Plasmid-DNA gespalten.

Die Reaktionen wurden mit Hilfe der Umkehrphasen HPLC verfolgt. Dabei wurden für alle biskationischen Naphthole anhand der HPLC-Elutionsprofile die Abnahme des biskationischen Naphtholes und die Zunahme der frei werdenden Abgangsgruppe bestimmt. Nur für die reaktivsten biskationischen Naphthole wurden auch die Umesterungsprodukte gemessen. Als interner Standard wurde 1-Nitronaphthalin **92** verwendet:



Denn dieser war unter den Reaktionsbedingungen inert und war außerdem so unpolar, daß es eine deutlich längere Retentionszeit hatte, als die weiteren Verbindungen im Reaktionsgemisch. Es wurden folgende biskationische Naphthole getestet:

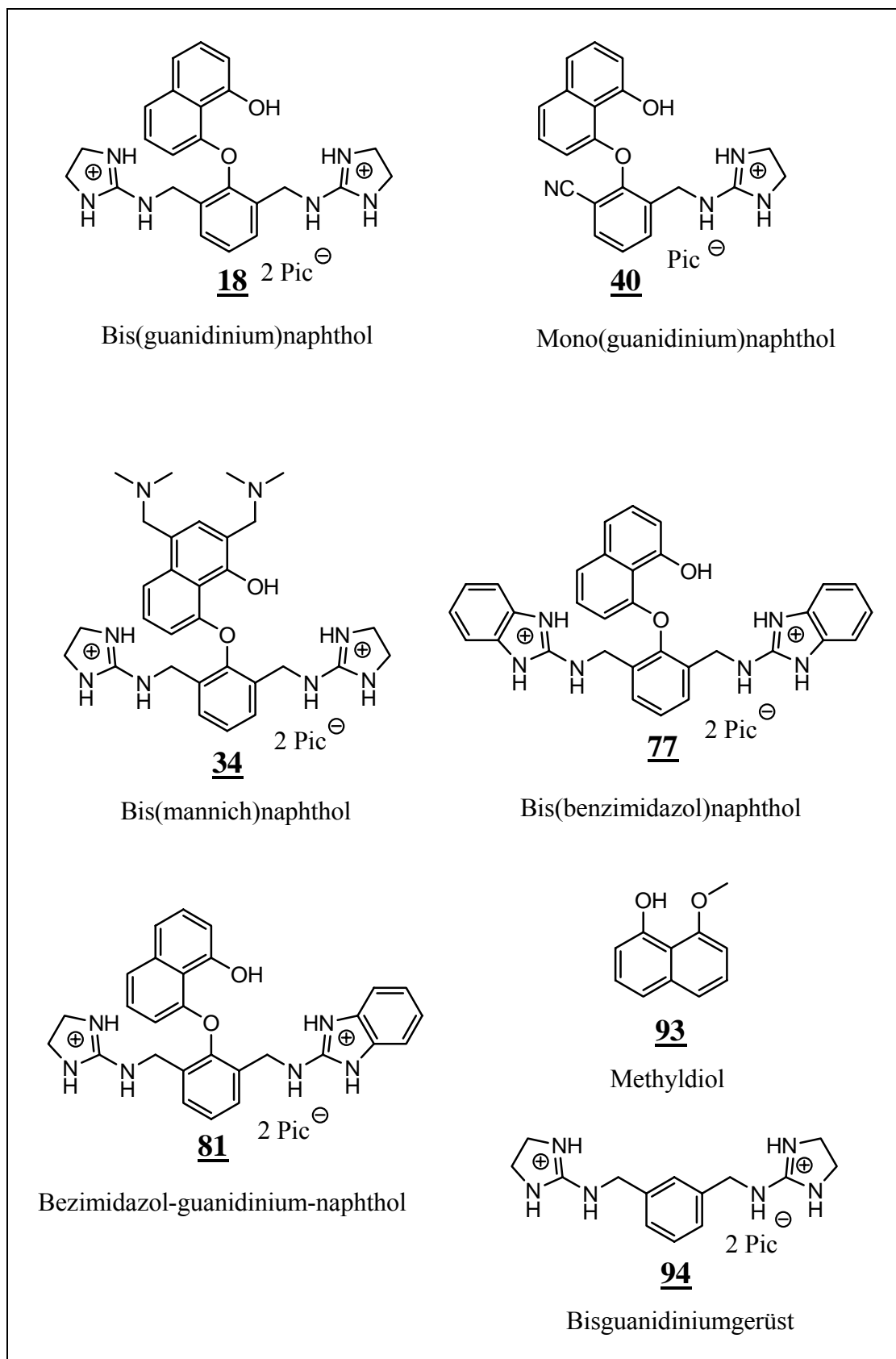
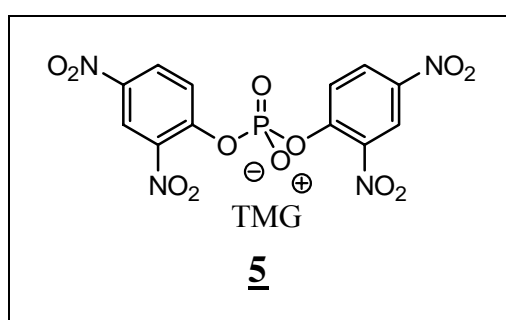


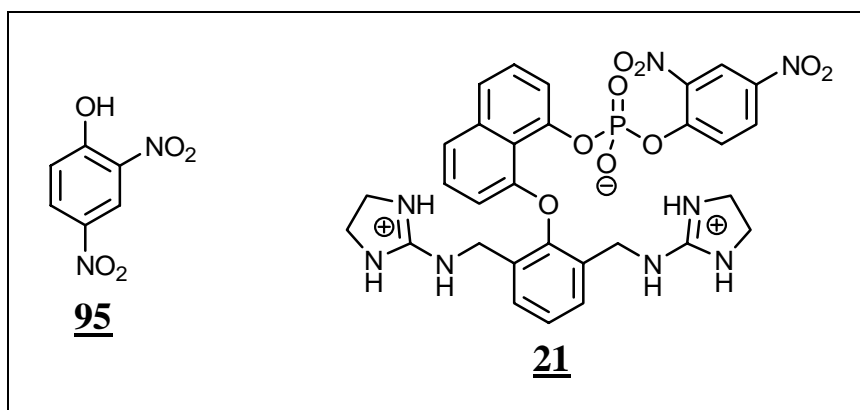
Abb. 10: Übersicht über alle kationischen Naphthtole, die mit 2,4-BDNPP **5**, 4-BNPP **9** und 4-MNPP **91** gemessen wurden.

5.1 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin

5.1.1 Reaktion ohne Wasser



Zunächst wurde das Bis(guanidinium)naphthol 18 mit dem 2,4-BDNPP 5 unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Guanidiniumnaphthol 18, 30 mM Phosphat 5, 250 mM Hünigbase) gemessen. Das Ergebnis war sehr erfreulich. Denn im Gegensatz zu den Guanidiniumalkohole von M. Muche⁶ und Arne Büsing⁷, entstand bei der Reaktion nur ein Produkt und zwar das gewünschte O-Phosphat 21.



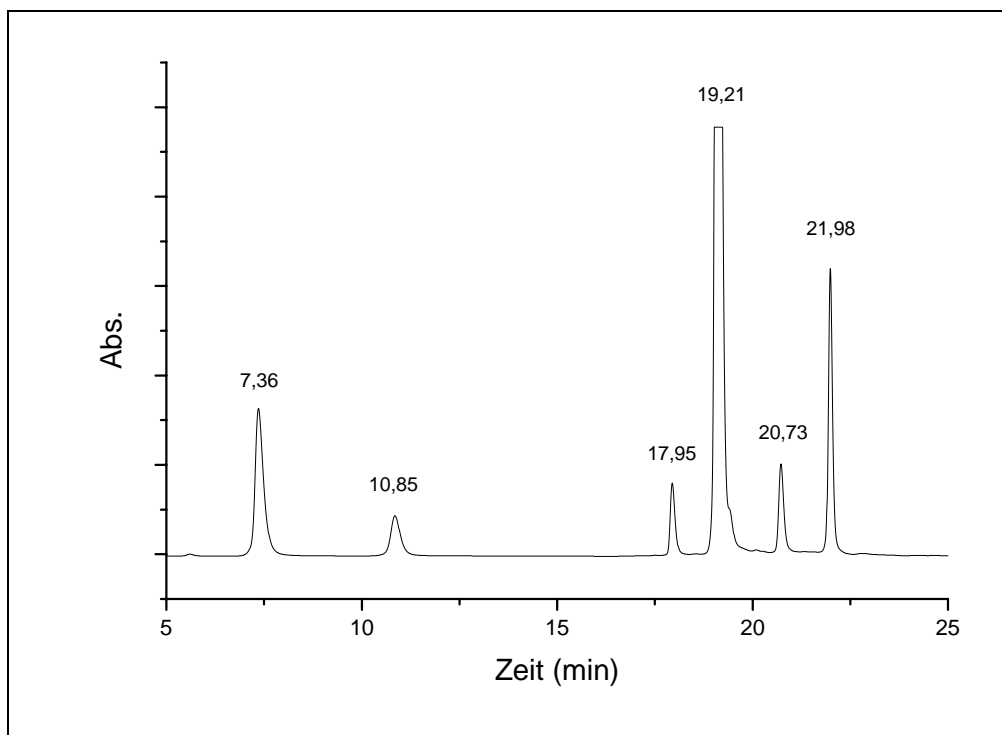


Abb. 11: Eluationsprofil der Reaktion nach 5min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

7.36 min: Pikrinsäure

10.85 min: 2,4-Dinitrophenol **95** (Abgangsgruppe)

17.85 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

19.21 min: 2,4-BDNPP **5**

20.73 min: O-Phosphat **21**

21.98 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Die Abbildung 11 zeigt ein typisches Eluationsprofil (5 min) der Reaktion von Bis(guanidinium)naphthol **18** mit 2,4-BDNPP **5**. Es sind nur zwei neue Peaks zu sehen, nämlich der Peak mit der Retentionszeit 10.85 min (2,4-Dinitrophenol **95**) und 17.85 min (O-Phosphat **21**). Um zu beweisen, dass es sich dabei um das gewünschte O-Phosphat **21** handelt, wurde die Reaktion in einem größeren Maßstab durchgeführt, die neu entstandene Verbindung sauber isoliert und schließlich mittels ^1H -NMR (400 MHz), ^{31}P -NMR (400 MHz) und MS (ESI^+) als das gewünschte O-Phosphat **21** (siehe 8.2.2) identifiziert. Denn die chemische Verschiebung des Phosphoratomsignals in ^{31}P -NMR sprach für einen O-Phosphat, und nicht für einen N-Phosphat.

Man kann die Integrale der Peaks mit Hilfe der jeweiligen Eichfaktoren in Konzentrationen umrechnen. Wenn man die gemessenen Konzentrationen von Bis(guanidinium)naphthol **18**, 2,4-Dinitrophenol **95** und O-Phosphat **21** gegen die Zeit aufträgt, erhält man folgenden Graphen:

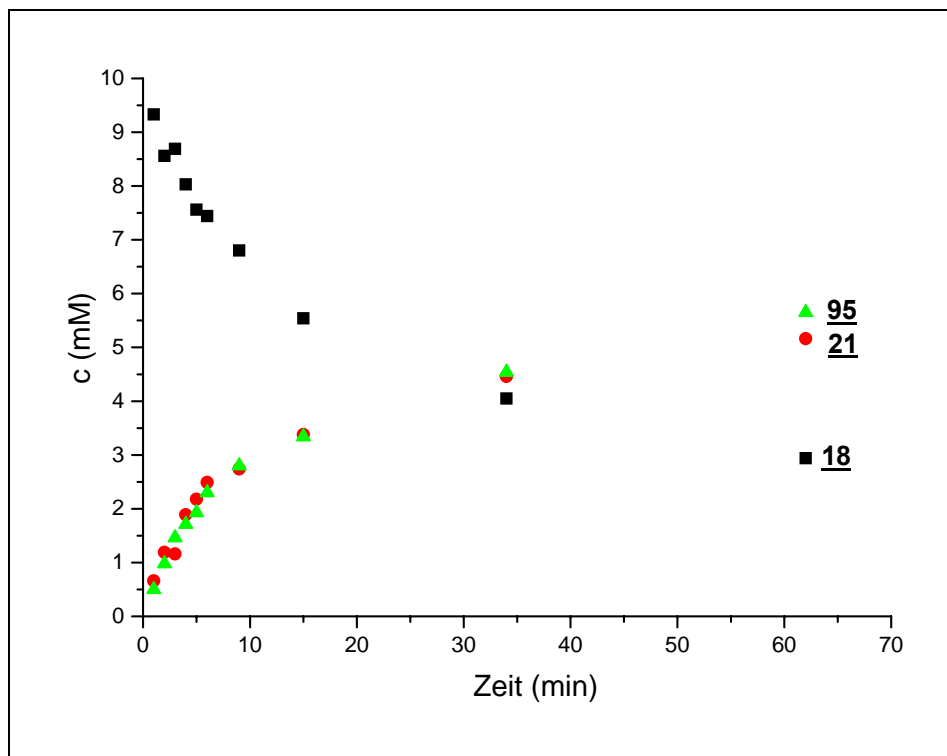


Abb. 12: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-Dinitrophenol **95** und O-Phosphat **21** mit der Zeit.

Die Abbildung 12 zeigt eine gute Korrelation zwischen der Abnahme von Bis(guanidinium)naphthol **18** und der Zunahme von 2,4-Dinitrophenol **95** und O-Phosphat **21**. Für die Annahme, daß es sich bei der Reaktion für die Anfangsphase um eine Reaktionsordnung 1 handelt, gilt folgende Gleichung:

$$\ln[C]_t - \ln[C]_0 = -kt$$

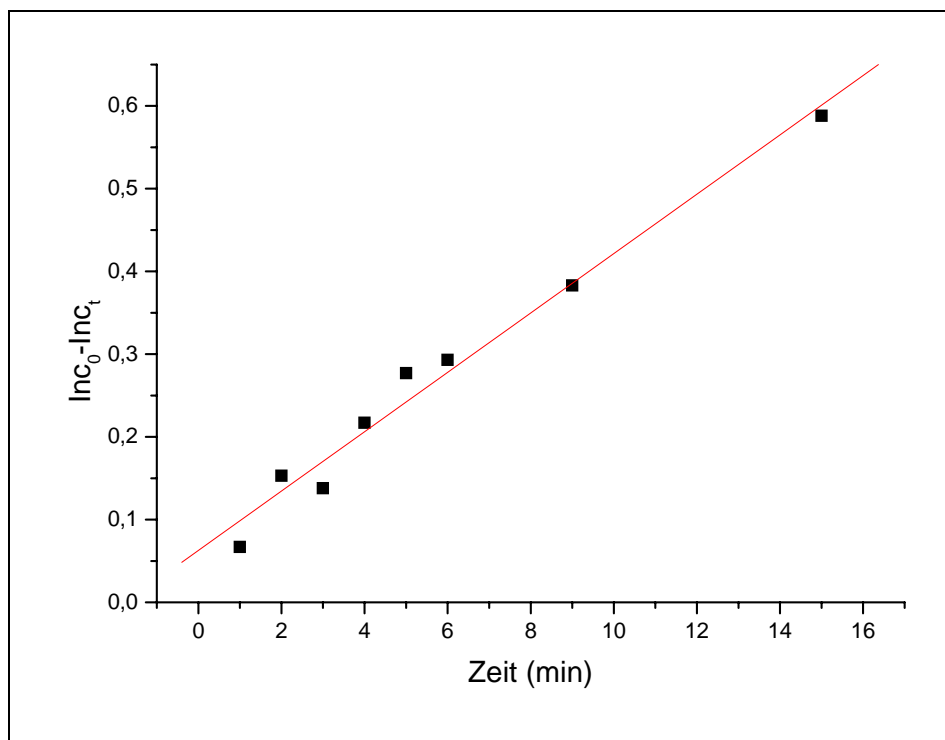
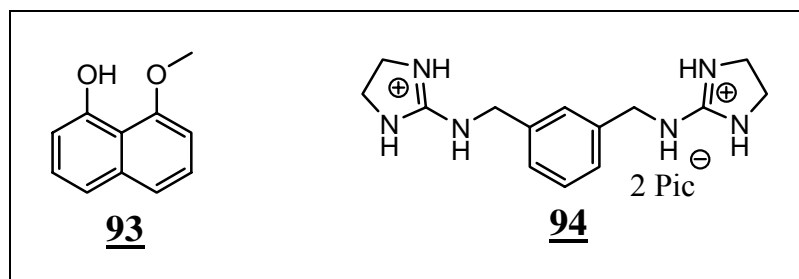


Abb. 13: Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit aus der Konzentrationsabnahme **18**.

In Abbildung 13 ist der Logarithmus der Konzentration von Bis(guanidinium)naphthol **18** gegen die Zeit aufgetragen. Die Abbildung zeigt, daß für die Abnahme von **18** die Reaktionsordnung 1 für die Anfangsphase gültig ist:

$$k_{\text{obs}} = 3.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

5.1.1.1 Der Einfluss der Aktivierung durch das Bis(guanidinium)gerüst 94



Es wäre möglich, daß das Diol 11 in Anwesenheit einer Base (z.B. N-Ethyl-diisopropylamin) nucleophil genug ist, um mit dem 2,4-BDNPP 5 zu reagieren. Um dies auszuschließen, wurde das Methyldiol 93 mit 2,4-BDNPP 5 unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Methyldiol 93, 30 mM Phosphat 5, 250 mM Hünigbase) getestet. Selbst nach einer Woche war keine Reaktion zu beobachten. Es wäre aber auch denkbar, daß das Diol 11 in Anwesenheit des Bis(guanidinium)gerüsts 94 mit dem 2,4-BDNPP 5 reagiert. Deswegen wurde das Methyldiol 93 und das Bis(guanidinium)gerüst 94 mit dem 2,4-BDNPP 5 unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Methyldiol 93, 10 mM Bis(guanidinium)gerüst 94, 30 mM Phosphat 5, 250 mM Hünigbase) getestet. Auch hier war keine Umsetzung zu dem gewünschten O-Phosphat 97 oder 98 zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die Konstitution des Bis(guanidinium)naphthol 18 sehr wichtig für seine Reaktivität ist. Denn ein quasi getrenntes Nucleophil und Bis(guanidinium)gerüst 94, zeigen keine Reaktivität. Bei der Reaktion zwischen Bis(guanidinium)naphthol 18 und 2,4-BDNPP 5 handelt es sich um eine quasi-intramolekulare Reaktion. Zunächst wird der 2,4-BDNPP 5 durch die Kationen des Bis(guanidinium)gerüsts 94 koordiniert und dann durch die Hydroxygruppe des Diolrestes nucleophil angegriffen.

5.1.2 Reaktionen in Anwesenheit von Wasser

Daß das Bis(guanidinium)naphthol **18** 2,4-BDNPP **5** in DMF/Hünigbase noch schneller spaltete als das Phenanthren **8** von A. Büsing,⁷ noch dazu selektiv nur zum gewünschten O-Phosphat **21** reagierte, erfüllte die in ihm gesetzte Erwartungen. Doch es war auch noch zu überprüfen, ob das Bis(guanidinium)naphthol **18** sich auch unter wässrigen Bedingung mit 2,4-BDNPP **5** umsetzen würde. Denn das Ziel dieser Arbeit war es, organische Verbindungen zu synthetisieren, die DNA hydrolytisch spalten. Deswegen wurde das Lösungsmittel DMF durch ein DMF/Wasser Gemisch ersetzt. Nur in einem Mischungsverhältnis von DMF/Wasser 2:1 waren alle Reaktanden die man für die Reaktion brauchte, löslich. Desweiteren wurde in wässrigem Lösungsmittel die schlecht lösliche Hünigbase durch Triethylamin (DMF/H₂O 2:1, 250 mM NEt₃, 30 °C, 10 mM Bis(guanidinium)naphthol **18**, 30 mM 2,4-BDNPP **5** und 30 mM Nitronaphthalin **92**) ersetzt.

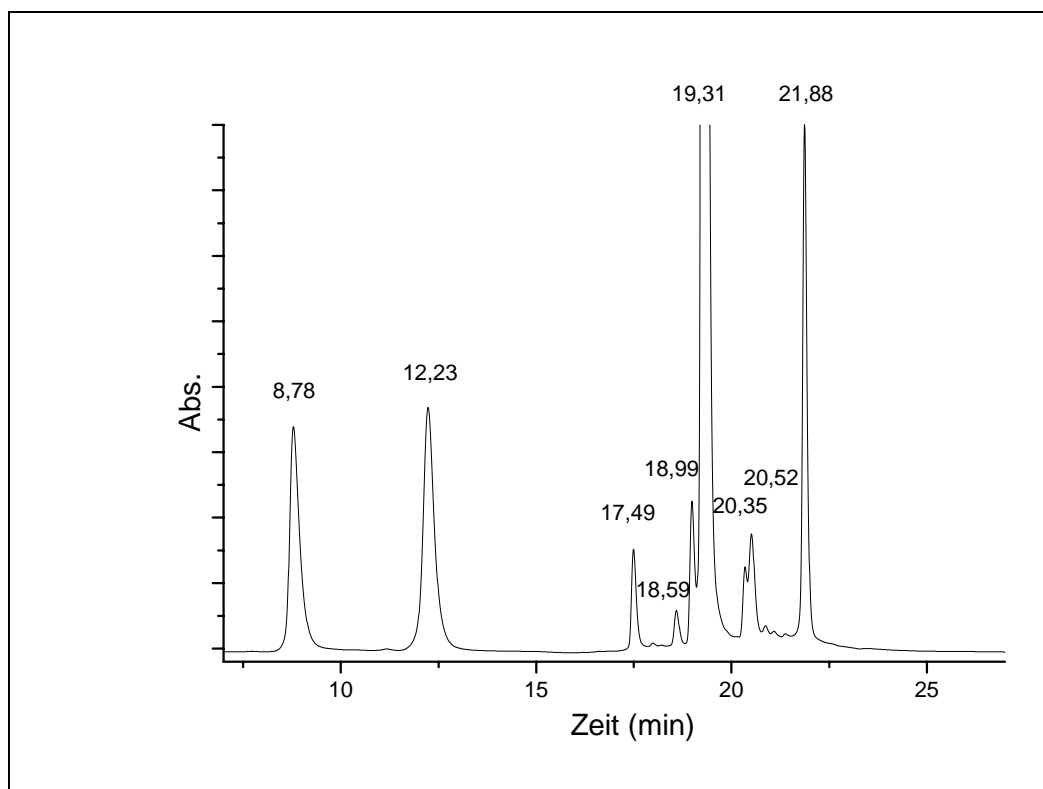


Abb. 14: Elutionsprofil nach 236 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

8.78 min : Pikrinsäure

12.23 min: 2,4-Dinitrophenol 95

17.49 min: Bis(guanidinium)naphthol 18

18.59 min: Unbekannt

18.99 min: freies Phosphat 22 [MS(ESI⁺): 511.12 (511.19 berechnet für C₂₄H₂₈N₆O₅P⁺) und ³¹P-NMR: ([D]DMSO, 400 MHz): 6.86 ppm]

19.31 min: 2,4-BDNPP 5

20.35 min: O-Phosphat 21 [¹H-NMR ([D]DMSO, 400 MHz), MS(ESI⁺): 677.3 (677.19 berechnet für C₃₀H₃₀N₈O₉P⁺) und ³¹P-NMR ([D]DMSO, 400 MHz): -11.40 ppm]

20.52 min: Unbekannt

21.88 min: 1-Nitronaphthalin 92

Im Gegensatz zu der Reaktion 5.1.1 in DMF, war bei der Reaktion von Bis(guanidinium)naphthol 18 in Anwesenheit von Wasser keine saubere Korrelation zwischen der Abnahme von Bis(guanidinium)naphthol 18 und der Zunahme von 2,4-Dinitrophenol 95 zu beobachten:

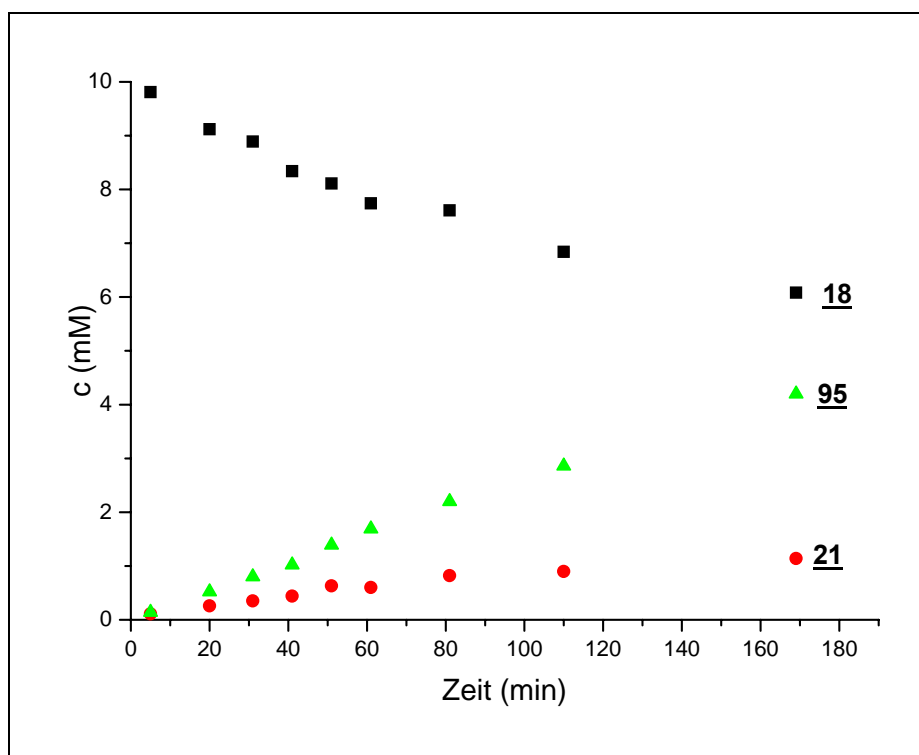


Abb. 15: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol 18 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

In Anwesenheit von Wasser entsteht zunächst das O-Phosphat **21**. Dieser setzt sich dann parallel zu ca. 2/3 in das freie O-Phosphat **22** (Kapitel 8.3.1.2.2) und ca. 1/3 in das Bis(guanidinium)naphthol **18** um. Damit kann man für die Reaktion zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-BDNPP **5** in Anwesenheit von Wasser folgenden Reaktionsverlauf formulieren (Abb. 16):

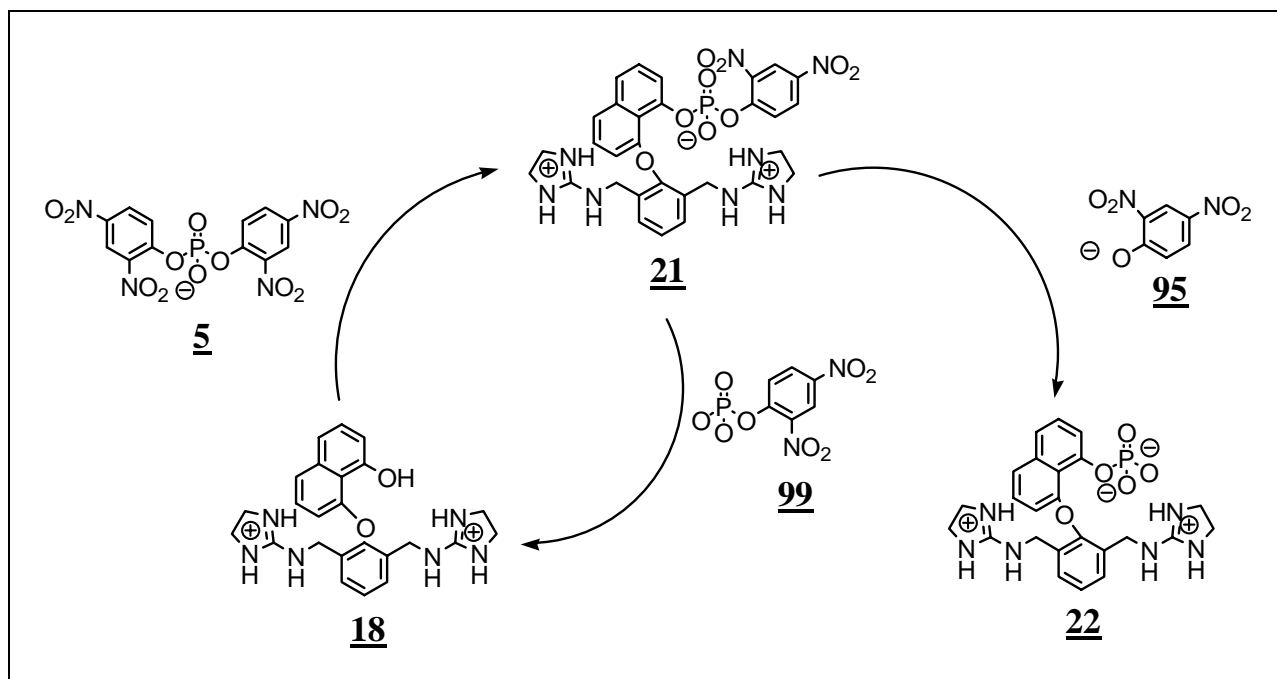


Abb. 16 Reaktionsverlauf zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-BDNPP **5** in DMF/H₂O (2:1).

Die Mischung von DMF/Wasser/250mM Triethylamin hatte einen pH-Wert von etwa 12. In diese Mischung wurde ein $k_{\text{obs}} = 3.1 \times 10^{-3}$ gemessen (DMF/250 mM Hünigbase: $k_{\text{obs}} = 3.6 \times 10^{-2}$). Damit sank die Reaktionsgeschwindigkeit in Wasser um den **Faktor 12**. Man wollte sich den physiologischen Bedingungen weiter nähern. Von daher wurden Reaktionen bei noch niedrigeren pH-Werten durchgeführt.

Dabei wurde zunächst eine 50 mM Trispuffer-Lösung hergestellt und diese mit doppelten Volumen abs. DMF gemischt. Davon wurden dann jeweils 200 µl in Eppendorfgefäßen überführt, in denen vorher die Reaktanden (10 mM Bis(guanidinium)naphthol **18**, 30 mM 2,4-BDNPP **5** und 30 mM Nitronaphthalin **92**) eingewogen wurden. Die verschiedenen pH-Werte in den Eppendorfgefäßen wurden mit 1 M HCl- bzw. 99 %ige NEt₃-Lösung eingestellt und dabei mit einer kleinen Glaselektrode gemessen.

Tabelle 4 : Zusammenfassung der gemessenen k_{obs} in unterschiedlichen pH-Werten (250mM NEt_3 ; DMF/ H_2O , 2:1).

pH	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$
11.7	3.1×10^{-3}
9.9	1.7×10^{-3}
8.99	1.4×10^{-3}
7.09	6.4×10^{-4}

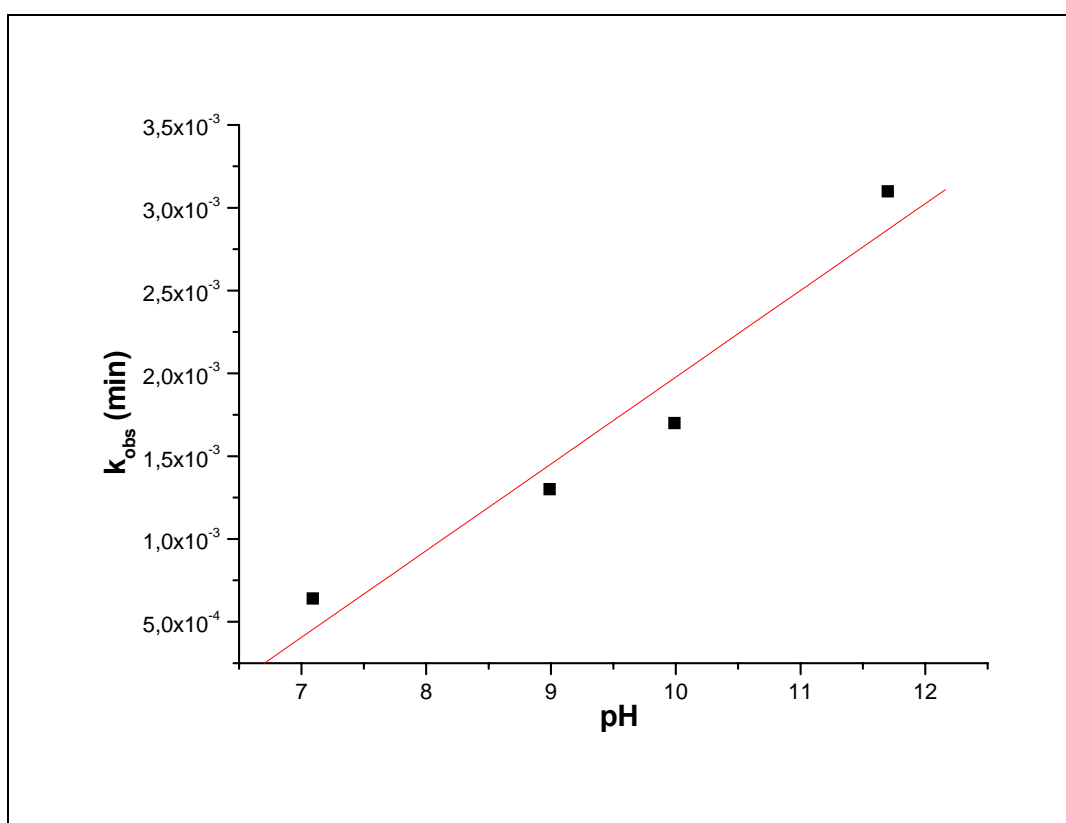


Abb. 17: k_{obs} gegen pH aufgetragen.

Die Abbildung 17 zeigt einen in guter Näherung linearen Zusammenhang zwischen den k_{obs} und den pH-Werten. Mit zunehmenden pH-Wert nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion zu. Das zeigt deutlich den Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktion. Im Vergleich zu pH 12 sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit unter neutralen Bedingungen (pH 7.09) lediglich um den **Faktor 5**.

5.2 Reaktionen von Bis(mannich)naphthol **34** mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester **5**, Salz mit Tetramethylguanidin

5.2.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser

Zunächst wurde das Bis(mannich)naphthol **34** mit 2,4-BDNPP **5** unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Guanidiniumnaphthol **34**, 30 mM Phosphat **5**, 250 mM Hünigbase) getestet. Das Ergebnis war jedoch nicht zufrieden stellend. Denn es gab gegenüber Bis(guanidinium)naphthol **18** keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Es wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Die Geschwindigkeit vom Bis(mannich)naphthol **34** mit 2,4-BDNPP **5** sank gegenüber dem Bis(guanidinium)naphthol **18** um **Faktor 19**.

5.2.2 Reaktion in Anwesenheit von Wasser

Es wurden bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH 10.6 und pH 7.71) die Reaktionen zwischen Bis(mannich)naphthol **34** und 2,4-BDNPP **5** (DMF/H₂O 2:1, 30 °C, 10 mM Bis(mannich)naphthol **34**, 30 mM 2,4-BDNPP **5**) gemessen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der gemessenen k_{obs} in unterschiedlichen pH-Werten.

pH	$k_{\text{obs}} [\text{min}^{-1}]$
10.6	1.2×10^{-3}
7.71	1.7×10^{-3}

Im Gegensatz zur Reaktion von Bis(guanidinium)naphthol **18** in DMF/H₂O ist die Reaktion vom Bis(mannich)naphthol **34** mit 2,4-BDNPP **5** (DMF/H₂O; 3:1) von pH-Wert weitgehend

unabhängig. Im neutralen Bereich ist die Reaktivität vom Bis(mannich)naphthol **34** mit 2,4-BDNPP **5** im Vergleich zu Bis(guanidinium)naphthol **18** um **Faktor 3** höher. Aus diesem Grund sollte das Bis(mannich)naphthol **34** besser Plasmid-DNA spalten, als das Bis(guanidinium)naphthol **18**.

5.3. Reaktionen von Mono(guanidinium)naphthol **40 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester **5**, Salz mit Tetramethylguanidin**

5.3.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser

Für die Reaktion von Mono(guanidinium)naphthol **40** mit 2,4-BDNPP **5** (DMF, 30 °C, 10 mM Guanidiniumnaphthol **40**, 30 mM Phosphat **5**, 250 mM Hünigbase) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit $k_{\text{obs}} = 3.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Die Geschwindigkeit sinkt gegenüber dem Bis(guanidinium)naphthol **18** um **Faktor 9**. Man sieht deutlich den Einfluss der zusätzlichen Guanidiniumreste auf die Reaktivität der Naphtholverbindung.

5.4 Reaktionen von Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit Phosphorsäure-bis-(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz der Tetramethylguanidin

5.4.1 Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Wasser

Für die Reaktion von Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit 2,4-BDNPP 5 (DMF, 30 °C, 10 mM Guanidiniumnaphthol 77, 30 mM Phosphat 5, 250 mM Hünigbase) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit $k_{\text{obs}} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ gemessen (8.3.5.1). Im Vergleich zum Bis(guanidinium)naphthol 18 sank die Geschwindigkeit bei pH 12 um den **Faktor 32**. Das war auch zu erwarten, weil bei pH 12 die Benzimidazole vollständig deprotoniert vorliegen. Denn für das Bis(benzimidazol)naphthol 67 wurde ein $\text{pK}_s = 6.4$ gemessen und für das Bis(guanidinium)naphthol 18 ein $\text{pK}_s = 10.3$. Durch Substitution der Guanidine durch Benzimidazolreste wollte man den pks-Wert der Bis(guanidinium)naphthole 18 erniedrigen. Damit wollte man die katalytische Eigenschaft der Verbindung in neutralen Bereich verbessern. Deswegen wurde eine Messung im neutralen Bereich (10 mM Guanidiniumnaphthol 77, 30 mM Phosphat 5 in DMF/Trispuffer (2:1) und pH 7.4, siehe 8.3.5.2) durchgeführt, um den Effekt der Benzimidazole auszunutzen. Es wurde für die Abnahme von 77 eine Geschwindigkeitskonstante von $8.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Damit stieg im Vergleich zu pH 12, die Geschwindigkeit um den **Faktor 7**. Im neutralen pH-Bereich war 77 sogar um den **Faktor 1.3** reaktiver, als das bis dahin reaktivste Bis(mannich)naphthol 34.

5.5. Reaktionen von Benzimidazol-guanidinium-naphthol 82 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester 5, Salz der Tetramethylguanidin

5.5.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser

Für die Reaktion von Benzimidazolguanidiniumnaphthol 82 mit 2,4-BDNPP 5 (DMF, 30 °C, 10 mM Guanidiniumnaphthol 82, 30 mM Phosphat 5, 250 mM Hünigbase) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit $k_{\text{obs}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Man erwartete, daß diese Verbindung eine Reaktivität zwischen der von Bis(guanidinium)naphthol 18 und vom Bis(benzimidazol)naphthol 77 besitzt. Eine Steigerung der Reaktivität im Vergleich zu Bis(benzimidazol)naphthol 77 war jedoch kaum festzustellen.

Zusammenfassung:

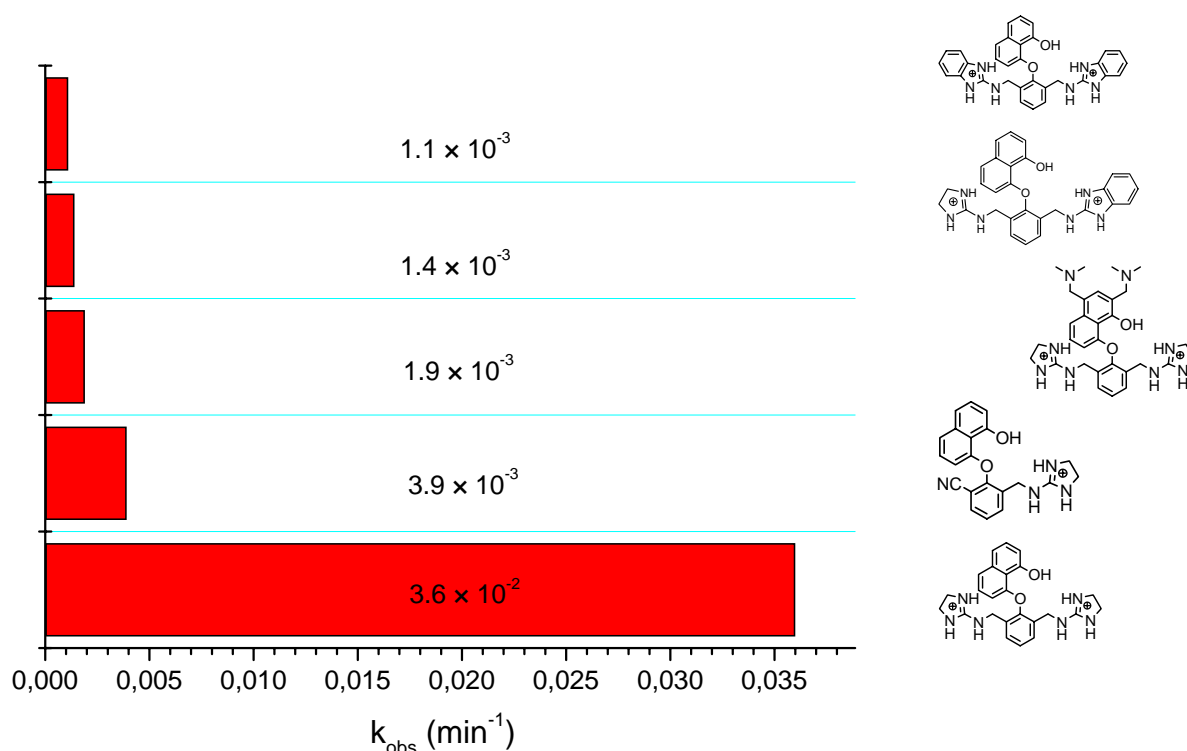
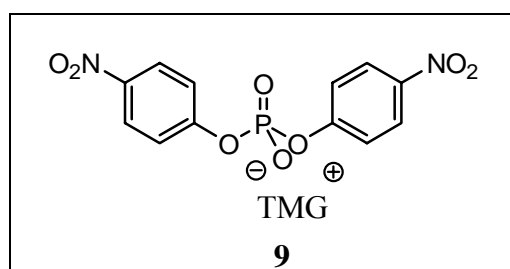


Abb. 18: Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen kationischen Naphthole mit 2,4-BDNPP 5 in DMF und 250 mM N-Ethyl-diisopropylamin (pH~ 12).

5.6 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(4-dinitrophenyl)ester 9, Salz mit Tetramethylguanidin

5.6.1 Reaktion in Ab- und Anwesenheit von Wasser



Da das Bis(guanidinium)naphthol 18 in Abwesenheit von Wasser mit 2,4-BDNPP 5 die höchste Reaktivität (Abb. 18) besaß, wurde es auch mit 4-BNPP 9 unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Bis(guanidinium)naphthol 18, 30 mM Phosphat 9, 250 mM Hünigbase) gemessen. Das Ergebnis war auch hier sehr zufrieden stellend. Denn es entstand im Gegensatz zu den Guanidiniumalkoholen von M. Muche⁶ und Arne Büsing⁷, nur das gewünschte O-Phosphat 23. Es wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 2.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Damit nahm die Reaktivität gegenüber den 2,4-BDNPP 5, um **Faktor 164** ab. Das war auch zu erwarten, denn 4-BNPP 9 ist deutlich unreaktiver, als 2,4-BDNPP 5. Um sich der physiologischen Bedingungen weiter anzunähern, wurde die Reaktion in DMF/H₂O (2:1) und 250 mM NEt₃ durchgeführt (8.3.6.2). Es wurde unter Berücksichtigung der Hintergrundhydrolyse von 4-BNPP 9, eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{\text{obs}} = 6.98 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Damit sank die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu DMF/Hünig Base, um den **Faktor 315**.

Wie in Kapitel 2 gezeigt wurde, konnte ausgehend von der Struktur des aktiven Zentrums des Komplexes zwischen der Topoisomerase I und eines 22 Basenpaaren langen DNA-Doppelstranges, ein Strukturmotiv für DNA spaltende künstliche Enzyme abgeleitet werden.

Mit Hilfe des Bis(guanidinium)naphthols **18** gibt es die ersten Hinweise für Richtigkeit dieses Strukturmotivs. Denn es war bis dahin die einzige metallfreie Verbindung, die mit 4-BNPP **9** mit der höchsten Geschwindigkeitskonstante zum gewünschten O-Phosphat **23** reagierte.

Zusammenfassung:

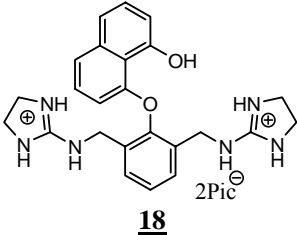
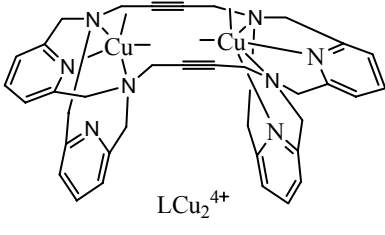
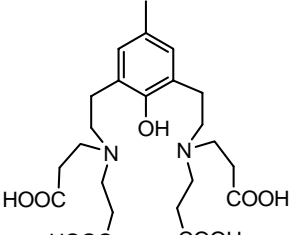
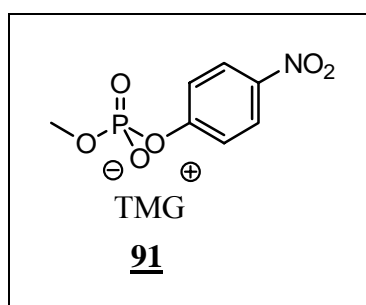
 <p>18</p>	 <p>106</p>	 <p>107</p>
6.98×10^{-7}	1.7×10^{-4}	6.0×10^{-4}
30 mM 4-BNPP 9 , 10 mM Katalysator und 250 mM NEt ₃ (pH 11.7) in DMF/H ₂ O (2:1); 30°C	50 mM 4-BNPP 9 , 2 mM Katalysator in pH 7; H ₂ O 55°C	1 mM 4-BNPP 9 , 0.1 mM Katalysator in pH 8; H ₂ O 37°C

Abb. 19: Die Geschwindigkeitskonstante (k_{obs} in min^{-1}) von **18** im Vergleich mit metallhaltigen Verbindungen.

In Abb. 19 ist die Geschwindigkeitskonstante von Bis(guanidinium)naphthol **18** mit Verbindungen verglichen, die Metallionen enthalten und zwar mit dem von Roland Krämer⁴⁰ und Lawrence Que⁴¹. Die Reaktivitäten sind in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Reaktionsbedingungen gemessen wurden. Obwohl **106** und **107** deutlich reaktiver sind als Bis(guanidinium)naphthol **18**, ist **18** bis heute die einzig bekannte metallfreie Verbindung, die mit 4-BNPP **9** in DMF/H₂O (2:1) und pH 11.7 überhaupt eine Aktivität zeigt.

5.7 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol **18** mit Phosphorsäuremethylester-4-nitrophenylester **91**, Salz mit Tetramethylguanidin

5.7.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser



Da das Bis(guanidinium)naphthol **18** in Abwesenheit von Wasser auch mit 4-BNPP **9** eine relativ hohe Reaktivität (Abb. 18) besaß, wurde es auch mit 4-MNPP **91** unter wasserfreien Bedingungen (DMF, 30 °C, 10 mM Bis(guanidinium)naphthol **18**, 30 mM Phosphat **91**, 250 mM Hünigbase) gemessen. Das Ergebnis war auch hier zufrieden stellend. Denn es zeigte auch Reaktivität gegenüber dem am wenigsten reaktiven Modellphosphat 4-MNPP **91**. Es wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 1.44 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ gemessen. Damit nahm die Reaktivität gegenüber 4-BNPP **9**, um den **Faktor 15** ab.

Tabelle 6: Zusammenfassung der gemessenen k_{obs} von Bis(guanidinium)naphthol **18** mit den verschiedenen Modellsubstraten (DMF/250 mM N-Ethyldiisopropylamin).

	$k_{\text{obs}} \text{ (min}^{-1}\text{) mit } \mathbf{18}$
2,4-BDNPP 5	3.6×10^{-2}
4-BNPP 9	2.2×10^{-4}
4-MNPP 91	1.44×10^{-5}

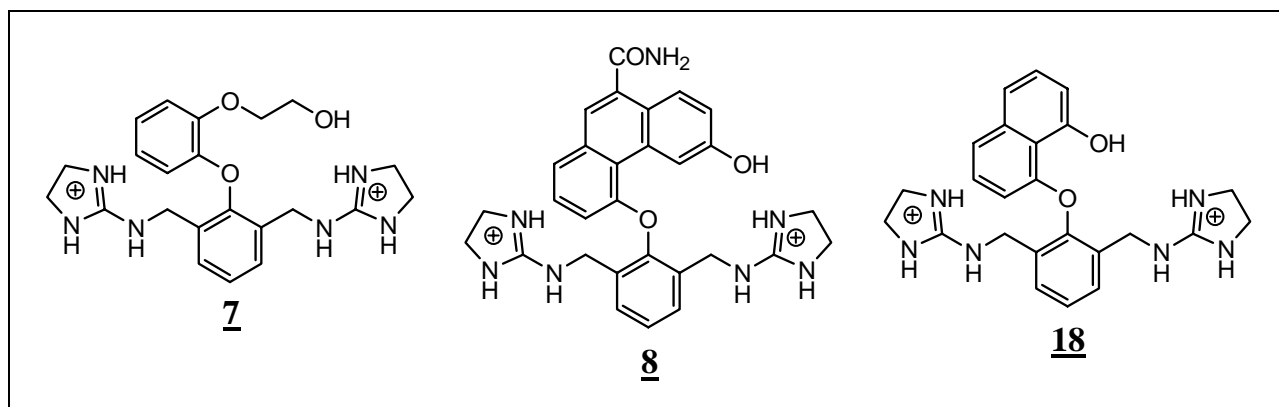
6. Plasmidspaltung mit den verschiedenen biskationischen Alkoholen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, künstliche Nucleasen auf der Basis von Bisguanidiniumalkoholen zu synthetisieren. Als DNA Substrat wurde Plasmid-DNA ausgewählt, da sich diese durch einige Besonderheiten auszeichnet. Plasmid-DNA liegt normalerweise in der superspiralisierten Form vor.²⁴ Die Phosphodiesterbindung dieser Konformation weist eine höhere Reaktivität im Vergleich zur Phosphodiesterbindung in der linearen (Form III) oder entspannten Konformation (Form II) der Plasmid DNA auf. Durch Öffnung einer Phosphodiesterbindung in einem der beiden DNA-Stränge wird die superspiralisierte Form in die open circle Form (Form II) überführt.⁴ Die Konformationsisomere lassen sich in einem Agarosegel elektrophoretisch auftrennen und sind so analytisch gut zugänglich.⁴³ Für die Experimente wurde das Plasmid pUC19 ausgewählt, da es sich hierbei um ein „high copy number“ Plasmid handelt und somit in guten Ausbeuten aus *E. coli* isoliert werden kann. Darüber hinaus liegt es zu einem hohen Anteil in der superspiralisierten Form (Form I) vor.

Die Reaktivität der Phosphodiesterbindung des Modellphosphats 4-BNPP **2** lässt sich gut mit der Reaktivität der Phosphodiesterbindung in Plasmid DNA vergleichen. Da ein Plasmid DNA aus etwa 5000 Nucleotiden aufgebaut ist, gibt es dementsprechend auch 5000 potentielle Spaltstellen und damit ist die Wahrscheinlichkeit auch um Faktor 5000 höher ein Plasmid DNA zu spalten, als ein 4-BNPP **2**. Alle potentielle Spaltprodukte ergeben aber ein Reaktionsprodukt – Form II DNA –. Auch die Ringspannung liefert einen kleinen Beitrag zu der Reaktivität der Phosphodiesterbindung in Plasmid DNA. Diese beiden Faktoren sorgen zusammen dafür, daß man die Reaktivität der Phosphodiesterbindung der Plasmid DNA gut mit der Reaktivität der Phosphodiesterbindung in Modellphosphat 4-BNPP **2** vergleichen kann. Aus diesem Grund ist 4-BNPP **2** ein gutes Testsystem für Plasmid DNA. Das konnte auch Lawrence Que⁴¹ beweisen, indem er für die Spaltung von 4-BNPP **2** ($k_{\text{obs}} = 6 \times 10^{-4} \text{ 1/min}$ in 100 mM Trispuffer pH 8 und 37 °C) und Litmus 29 Plasmid ($k_{\text{obs}} = 9 \times 10^{-3} \text{ 1/min}$ in 10 mM Trispuffer pH 8 und 37 °C) durch Verbindung **107** eine vergleichbare Reaktivität gemessen hat. Aus diesem Grund wurden die Bisguanidiniumalkohole in dieser Arbeit zunächst mit 4-BNPP **2** in dem aprotischen Lösungsmittel DMF in Anwesenheit einer Hilfsbase (N-Ethyl-diisopropylamin) getestet. Da sich diese Ergebnisse jedoch nur begrenzt auf wässrige Reaktionsbedingungen übertragen lassen, war es erforderlich, ein an

physiologische Bedingungen angenähertes Testsystem (Umsetzung der Bisguanidiniumalkohole mit 4-BNPP **9** in DMF/H₂O (2:1), pH 11.7) zu etablieren. Gute Resultate wurden mit dem Bis(guanidinium)naphthol **18** erhalten; unter aprotischen Reaktionsbedingungen wurde für die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} ein Wert von 2.2×10^{-4} (Kapitel 8.3.6.1) und in basisch wässriger Umgebung ein Wert von 6.98×10^{-7} (Kapitel 8.3.6.2) ermittelt. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, daß die Reaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** ausreichen könnte, um ein Plasmid-DNA zu spalten.

6.1 Plasmidspaltung mit den Verbindungen der zweiten und dritten Generation



Bei den Verbindungen der zweiten und dritten Generation handelt es sich um das Glycol **7**, das Phenanthren **8** und Bis(guanidinium)naphthol **18**. Diese Bisguanidiniumalkohole zeichnen sich durch eine hohe Reaktivität gegenüber dem Modellphosphat 4-BNPP **9** aus (siehe Kapitel 2.2.3). Sie unterscheiden sich jedoch im Hinblick auf die gebildeten Reaktionsprodukte; so konnte für das Bis(guanidinium)naphthol **18** gezeigt werden, daß nur das O-Phosphat **21** gebildet wurde (Kapitel 8.3.6.1). Aus diesem Grund sollte es zuerst mit Plasmid DNA getestet werden. Die Plasmidspaltungen von pUC19 wurden mit nach der Vorschrift 8.5.2 in 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) bei 37 °C für 18 h durchgeführt.

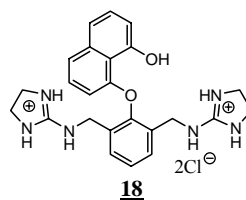
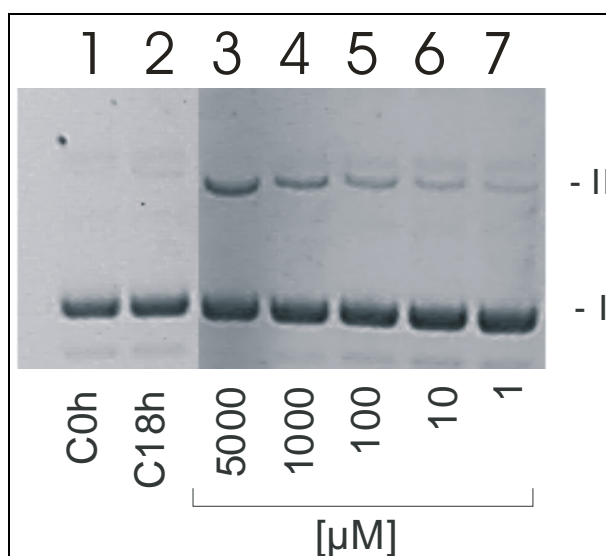


Abb. 20: Plasmidspaltung mit Bis(guanidinium)naphthol **18**.

Abbildung 20 zeigt die Plasmidspaltung von Bis(guanidinium)naphthol **18** (Bahnen 3-7). In der Tabelle 7 sind prozentuale Anteile der Form II angegeben. Dabei kann man bis zu einer Konzentration von 100 μM des Bis(guanidinium)naphthols **18** die Ausbildung der Form II beobachten. Geringere Konzentrationen des Bis(guanidinium)naphthols **18** weisen keine Spaltaktivität mehr auf; die im Agarosegel erkennbaren Form II-Banden (Abb. 20) bei 10 und 1 μM lassen sich auf eine Hintergrundhydrolyse zurückführen. Der Anteil der Hintergrundhydrolyse wird anhand einer Kontrollprobe bestimmt, die in Abwesenheit des Bis(guanidinium)naphthols **18** inkubiert wurde (Bahn 2).

Tabelle 7: prozentuale Anteile an Form II der plasmidischen DNA, der in der Abb. 20 gezeigten Plasmidspaltung (n. b. = nicht bestimmbar).

Experiment	Form II [%]
Kontrolle: 0 h	n. b.
Kontrolle: 18 h	3.1
5000 μM	20.4
1000 μM	14.9
100 μM	10.0
10 μM	7.5
1 μM	3.5

Mit der Plasmidspaltung durch Bis(guanidinium)naphthols **18** (Abb. 20) wurde auch hier wie bei Lawrence Que⁴¹ bewiesen, daß 4-BNPP **2** ein gutes Testsystem für Plasmid DNA ist. Nun wurden auch die reaktivsten Verbindungen der zweiten und dritten Generation einer Plasmidspaltung unterzogen.

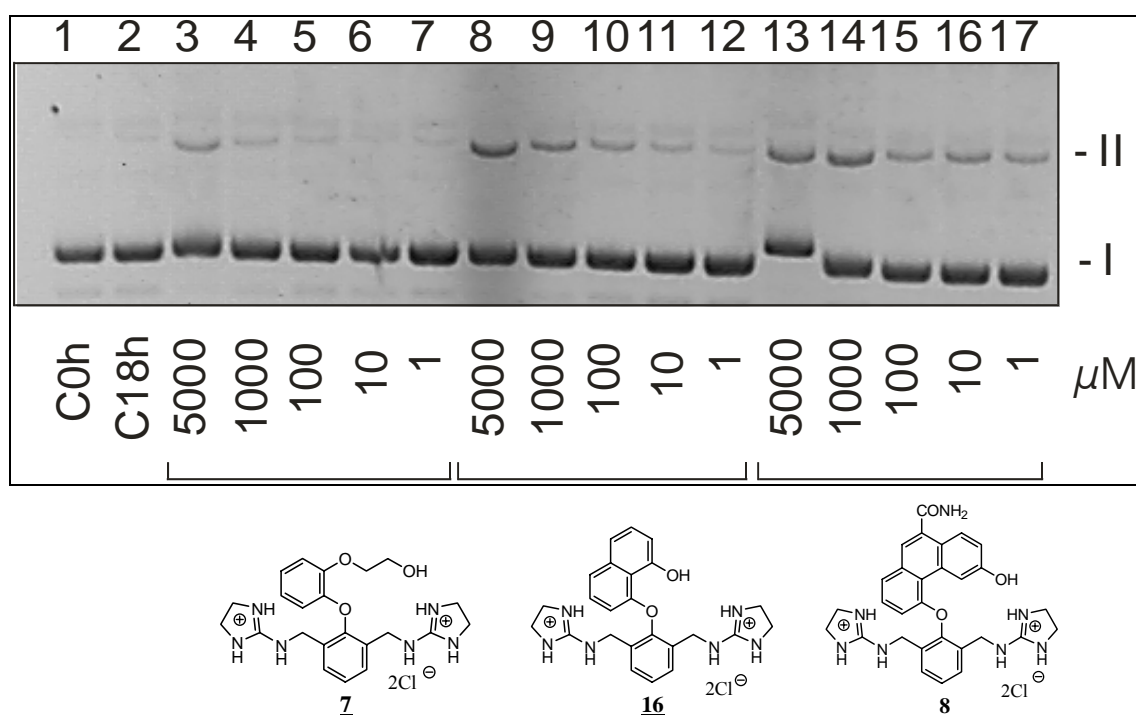


Abb. 21: Plasmidspaltung der Verbindungen zweiter und dritter Generation.

Tabelle 8: prozentuale Anteile an Form II der Plasmid DNA, der in der Abb. 21 gezeigten Agarosegels.

Experiment	Form II [%] <u>7</u>	Form II [%] <u>8</u>	Form II [%] <u>18</u>
Kontrolle 0 h	n. b.	n. b.	n. b.
Kontrolle 24 h	3.8	3.8	3.8
5000 μ M	12.8	22.4	24.9
1000 μ M	6.2	23.4	16.2
100 μ M	4.8	15.1	10.3
10 μ M	0.8	15.7	5.9
1 μ M	3.4	11.4	5.5

Beim Vergleich der Spaltaktivitäten von Verbindungen der zweiten und dritten Generation von fällt auf, daß das Bis(guanidinium)naphthol **18** (Abb. 21, Bahnen 8-12, Tabelle 8) über eine mit dem Phenanthren **8** (Abb. 21, Bahnen 13-17, Tabelle 8) gleich große Aktivität verfügt. Bei 5000 μ M zeigt das Phenanthren **8** eine Bandenverschiebung in der Form I. Diesen Effekt kann man sich dadurch erklären, daß bei hoher Katalysatorkonzentration zur eine Interkalation von Phenanthrenrest mit Basen der DNA kommt. Das Glycol **7** (Abb. 21, Bahnen 3-7, Tabelle 8) hingegen weist nur eine sehr geringe Spalteffizienz auf. Mit dieser Plasmidspaltung durch Bis(guanidinium)naphthol **18** und Phenanthren **8**, wurden die ersten wichtigen Erfolge im Bereich der künstlichen metallfreien Nucleasen erzielt. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, daß recht hohe Katalysatorkonzentrationen notwendig sind, um die Form I DNA in Form II zu überführen. Die Hauptaufgabe bestand nun darin, diese gezeigte Spalteffizienz deutlich zu steigern, um mit geringer Konzentration an Katalysator den reaktiven Phosphodiester der Plasmid-DNA zu spalten. Ein möglicher Weg liegt in der Einführung einer Hilfsbase in Ortho position zur OH-Gruppe, diese würde die Nucleophilie weiter erhöhen und somit ebenfalls die Reaktivität. Auch die dadurch entstehende positive Ladung würde einen zusätzlichen Beitrag zu der elektrophilen Katalyse liefern. Daß dies durchaus möglich ist, wurde bereits von M. Muche bewiesen (Kapitel 3).⁶ Eine andere Strategie wird mit der Einführung eines Acridinrestes verfolgt. Da Acridine mit den Basen der DNA interkalieren, kann man dadurch die Bindungsaffinität des Katalysators zur DNA und somit die Effizienz der katalysierten Reaktion erhöhen.⁴⁴ Aus diesen Gründen wurden das Bis(mannich)naphthol **34** und das Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69** synthetisiert. Das Bis(mannich)naphthol **34** enthält Mannichbasen in der Ortho- und Paraposition zu der OH-

Gruppe des Naphtholrests. Bei dem Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69** ist ein Acridinrest über einem C6-Linker an das Bis(guanidinium)naphthol **34** gekuppelt.

6.2 Plasmidspaltung mit den Verbindungen der neuesten Generation

6.2.1 Plasmidspaltung mit Bis(mannich)naphthol **34**

Zur Bestimmung der DNA-Spalteigenschaften von Bis(mannich)naphthol **34** wurde diese in einem Konzentrationsbereich von 1000 μM bis 1 μM zusammen mit pUC19 inkubiert (Abb. 22, Bahnen 3-11).

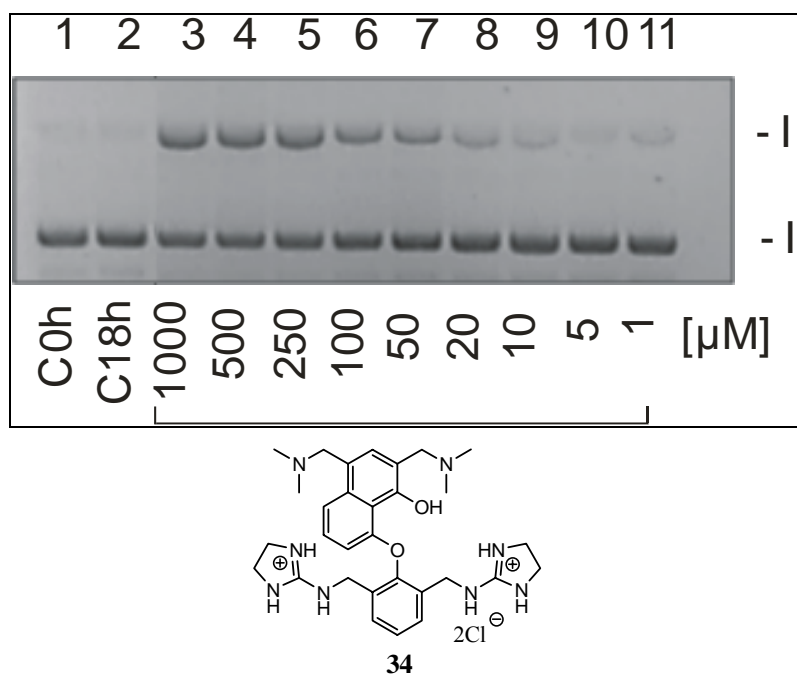


Abb. 22: Plasmidspaltung mit Bis(mannich)naphthol **34**.

Tabelle 9: prozentuale Anteile an Form II DNA, des in Abb. 22 gezeigten Agarosegels.

Experiment	Form II [%]
Kontrolle: 0 h	6.3
Kontrolle: 18 h	7.0
1000 μ M	46.0
500 μ M	45.2
250 μ M	42.9
100 μ M	32.3
50 μ M	27.4
20 μ M	19.4
10 μ M	10.7
5 μ M	12.1
1 μ M	7.2

Wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist, erfolgte eine signifikante Plasmid-Spaltung bis zu einer Konzentration von 20 μ M. Vergleicht man nun die Effizienz der Plasmidspaltung von Bis(guanidinium)naphthol **18** (16.2% FormII bei 1 mM; Tabelle 8) mit Bis(mannich)naphthol **34** (19.4% Form II bei 20 μ M, Tabelle 9) sieht man deutlich, daß mit dem Bis(mannich)naphthol **34** die Spalteffizienz um den **Faktor 50** gegenüber dem Bis(guanidinium)naphthol **18**, erhöht wurde. Die Strategie, über die Einführung von Hilfsbasen die Reaktivität zu steigern erwies sich als recht erfolgreich. Es ist bekannt, daß Mannichverbindungen in sauren Lösungsmitteln eine Eliminierung zum Chinomethid (Kapitel 4.1.5, Schema 2) eingehen können. Aus diesem Grund müsste auch die Spalteffizienz des Bis(mannich)naphthol **34**, in sauren Lösungsmitteln mit der Zeit gegenüber dem Plasmid stark abnehmen. Deswegen wurde die Spaltaktivitäten von zwei Tagen alten Bis(mannich)naphthol **34** (Tabelle 10: neu) und von in Wasser gelöstem, für vier Monate bei -20 °C gelagertem Bis(mannich)naphthol **34** (Tabelle 9: alt) miteinander verglichen.

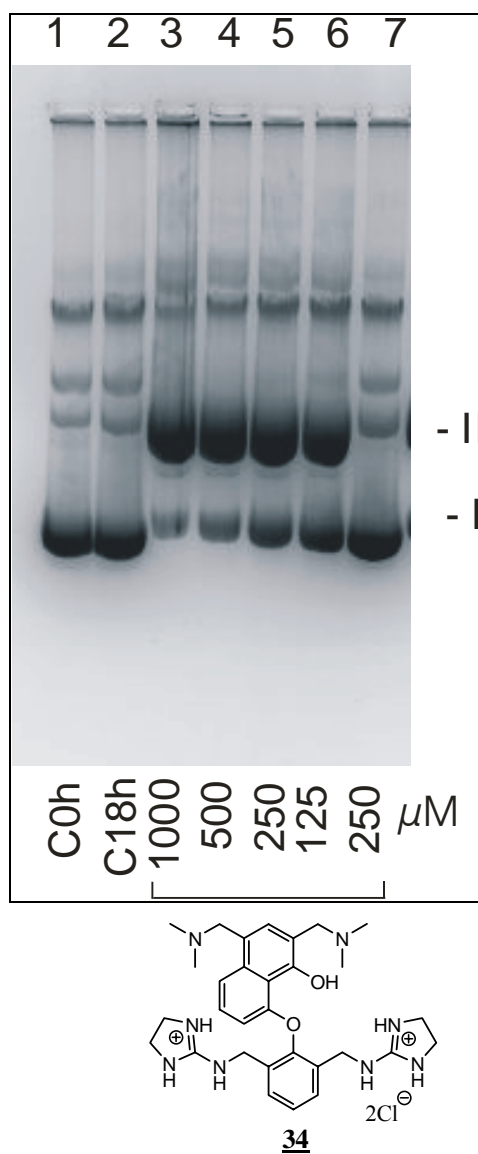


Abb. 23: Stabilitätstest von wässrigen Lösungen von Bis(mannich)naphthol **34**.

Tabelle 10: prozentuale Anteile an Form II der plasmidischen DNA, der in der Abb. 23 gezeigten Plasmidspaltung.

	Konz. [μM]	Form II [%]
Kontrolle 0 h	0.8	0.8
Kontrolle 0 18	2.7	2.7
neu 34	1000	64
	500	59
	250	47
	125	39
alt 34	250	3

In Abbildung 23 ist die Plasmidspaltung mit frischem (neu) Bis(mannich)naphthol **34** (Bahn 3-6) und für vier Monate bei -20 °C (20 mM in Wasser, alt) gelagertem Bis(mannich)naphthol **34** (Bahn 7) dargestellt. Wenn man sich die 250 µM Proben in der Tabelle 10 anschaut, dann sieht man deutlich, daß ein frisch synthetisiertes Bis(mannich)naphthol **34** viel höhere Spalteffizienz besitzt, als ein altes. Daraus lässt sich schließen, daß die Lagerung in deionisiertem Wasser auch bei einer Lagertemperatur von -20°C die Zersetzung der Bis(mannich)naphthol **34** nicht unterdrücken kann. Experimente sollten daher mit frisch angesetzten Lösungen durchgeführt werden.

6.2.3. Plasmidspaltung mit acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol 69

Acridine besitzen die Fähigkeit, sich zwischen den Basenpaaren der DNA einzulagern.²² Das Acridinkonjugat **69** sollte daher eine höhere Affinität zur DNA als die Grundverbindung (Bis(guanidinium)naphthol **18**) besitzen. Um den Effekt des Acridins nachweisen zu können, wurden Plasmidspaltungen mit Bis(guanidinium)naphthol **69** und Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69** in An- und Abwesenheit von NaCl durchgeführt.

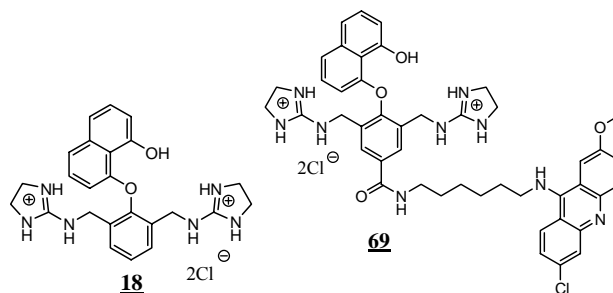
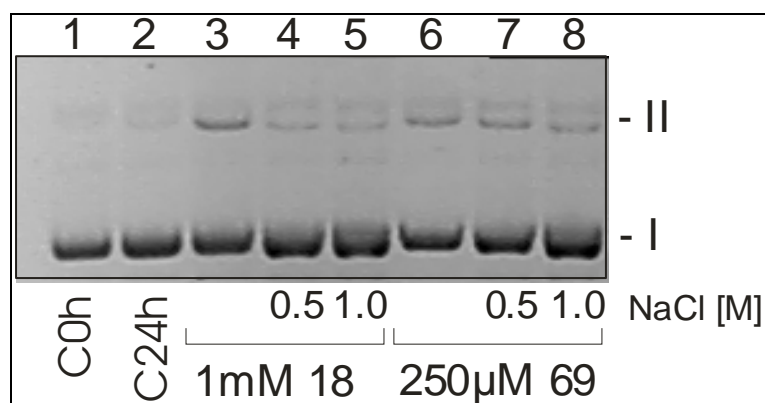


Abb. 24: Plasmidspaltung mit Bis(mannich)naphthol **18** und Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69** (0 h- und 18 h Kontrolle nicht bestimmbar).

Zunächst soll die Spaltaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** (Abb. 24, Bahn 3) mit der des Acridin-Bis(guanidinium)naphthols **69** (Abb. 30, Bahn 6) verglichen werden. Der Tabelle 11 ist zu entnehmen, daß mit nur 250 µM Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69** die gleiche Menge an Form II DNA gebildet wird wie mit 1 mM Bis(guanidinium)naphthol **18**. Die Spaltaktivität der Grundverbindung wird durch Einführung des Acridinrestes um den **Faktor 4** erhöht. Was jedoch erstaunlich ist, daß es bei Acridin-Bis(guanidinium)naphthols **69** zur keiner Bandenverschiebung wie bei Phenanthren **8** (bei hoher Katalysatorkonzentration) zu beobachten ist, obwohl auch Acridinreste gut mit dem Basen der DNA interkalieren. Der Einfluss von NaCl auf die Spaltaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** und des Acridin-Bis(guanidinium)naphthols **69** ist in Bahn 4 und 5 bzw. Bahnen 7 und 8 gezeigt.

Mit 0.5 M NaCl im Spaltansatz wird die Spaltaktivität des Bis(guanidinium)naphthols **18** vollständig unterdrückt (Tabelle 11). Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und den biskationischen Naphtholen werden durch NaCl aufgehoben. Dadurch findet keine Komplexbildung von Katalysator und DNA mehr statt, die Phosphodiesterhydrolyse bleibt aus. Im Gegensatz dazu bleibt die Spaltaktivität der Acridinverbindung sogar bis zu einer Konzentration von 1 M NaCl unbeeinflusst. Durch diese Ergebnisse kann belegt werden, daß die hydrophoben Wechselwirkungen des Acridinrests zu einer Steigerung der Affinität von Verbindung **69** zur Plasmid-DNA beitragen. Die Spaltaktivität des Acridin-

Bis(guanidinium)naphthols **69** hat sich unerwarteterweise nur um einen Faktor von vier gegenüber der Grundverbindung erhöht. Ein Grund hierfür könnte in der Wahl des Alkyllinkers liegen. Durch seine hydrophoben Eigenschaften können Wechselwirkungen mit den Guanidiniumresten – Abschirmung des Reaktionszentrums - nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss des Linkers näher zu untersuchen, wurde das Acridin-Bis(mannich)naphthol mit einem hydrophilen Linker synthetisiert (Acridin-Bis(mannich)naphthol **75**).

Tabelle 11: prozentuale Anteile an Form II DNA, der in der Abb. 30 gezeigten Agarosegels (n. b. = nicht bestimmbar).

	Form II <u>18</u>	% Form II <u>69</u>
Ohne NaCl	13.9	15.9
500 mM NaCl	n. b.	13.2
1 M NaCl	n. b.	15.9

6.2.4 Plasmidspaltung mit acridingelabeltem Bis(guanidinium)naphthol 75

In Verbindung **75** wurde zum einen der hydrophobe Linker durch einen hydrophilen PEG-Linker ersetzt, und zum anderen im Vergleich zum Acridin-Bis(guanidinium)naphthol **69**, zusätzlich die Mannichbasen eingeführt. Damit sollte es möglich sein, die Reaktivität des Bis(mannich)naphthols **34** weiter zu erhöhen.

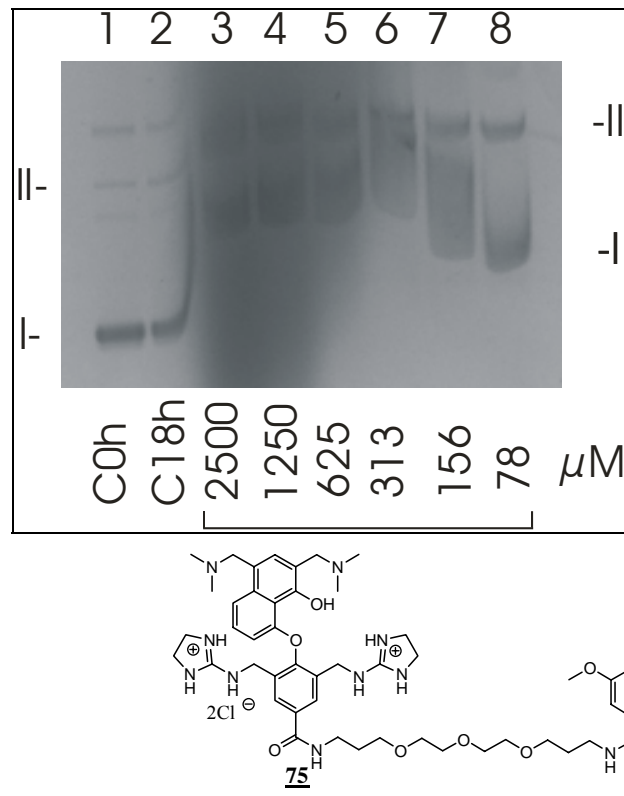


Abb. 25: Plasmidspaltung mit acridingelabeltem Bis(mannich)naphthol **75**.

Bei der Analyse der Plasmidspaltung durch Bis(mannich)naphthol **75** traten einige Probleme auf, die eine klare Aussage unmöglich machten (Abb. 25). Zunächst einmal sind alle Plasmid-Banden der mit Acridin-Bis(mannich)naphthol **75** inkubierten Proben (Bahnen 3-8) stark retardiert. Darüber hinaus wurden die DNA Banden nicht mehr gut aufgelöst und erscheinen daher stark verbreitert. Hohe Konzentrationen der Verbindung (Bahnen 3-6) führten zu einer Ausfällung der DNA in den Probestaschen des Agarosegels. Es erschien daher nicht sinnvoll, eine Quantifizierung der Bandenintensitäten vorzunehmen. Daher ist es sehr wichtig, daß die Plasmidspaltung durch Bis(mannich)naphthol **75** auch bei niedrigen Katalysatorkonzentrationen (z. B. 1-100 μM) durchgeführt wird.

6.2.5 Mechanistische Studien der Plasmidspaltung durch Bis(mannich)naphthol 34

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, daß sich Bisguanidiniumalkohole als metallfreie Nucleasen eignen.⁵ Darüber hinaus gelang es, durch Modifikation des Katalysators die Spaltaktivität zu erhöhen. Da der Mechanismus, nach dem die DNA Spaltung abläuft, für die Zielsetzung Katalysatoren für hydrolytische Spaltung oder Umesterung von Phosphodiestern zu entwickeln, eine bedeutende Rolle spielt, was es erforderlich Untersuchungen zur Aufklärung des Spaltmechanismus durchzuführen. Generell kann die DNA Spaltung entweder hydrolytisch oder durch Oxidation/Depurinierung erfolgen.⁴⁵ Wie Abb. 26 zeigt, sind verschiedene Spaltprodukte bei der DNA-Spaltung denkbar. Durch gezielten Nachweis der für den jeweiligen Spaltmechanismus charakteristischen Spaltprodukte lassen sich Aussagen über den Reaktionsweg machen.

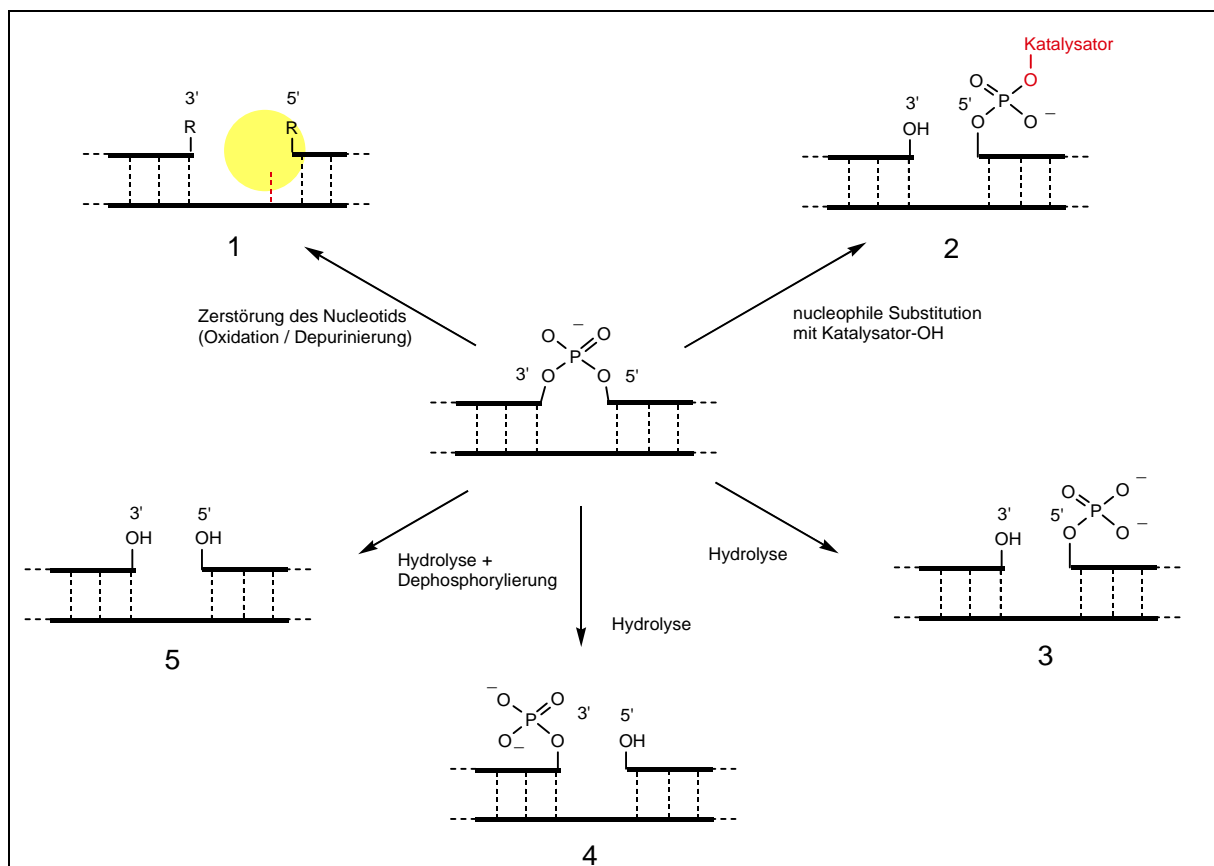


Abb. 26: Mögliche Mechanismen der DNA-Spaltung.

Die Oxidation bzw. Depurinierungsreaktion führt zur Abspaltung einer Base im DNA-Strang und somit zu einer irreversiblen Veränderung der DNA Sequenz (Spaltprodukt 1).⁴ Bei der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung kann sich der Phosphatrest entweder am 5'-Ende (Spaltprodukt 3) oder am 3'-Ende (Spaltprodukt 4) befinden. Enzymreaktionen (Eco RI) führen zu am 5'-Ende phosphorylierter DNA. Die Hydrolyse kann aber auch mit einer anschließenden Dephosphorylierung verbunden sein. Damit würde man Spaltprodukt 5 erhalten. Für die mit Bisguanidiniumalkoholen katalysierte Reaktion wäre es aber auch denkbar, daß eine stabile Bindung zwischen dem Katalysator und dem 5'-oder 3'-Phosphat-Strang entsteht und somit der Katalysator kovalent gebunden bleibt. Wie Eingangs erwähnt, ist angestrebt, Katalysatoren die DNA hydrolytisch spalten, zu entwickeln. Daher muss zunächst das Vorliegen eines oxidativen Mechanismus ausgeschlossen werden.

6.2.6 Plasmidspaltung unter sauerstofffreien Bedingungen

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich durch Luftsauerstoff der Naphtholrest zu einem Naphthoxylradikal oxidieren lässt (Abb. 25). Das Naphthoxylradikal wiederum kann an allen Positionen der Kohlenstoffatome der Ribose angreifen. Im nachfolgenden Schema (Abb. 25) sind die einzelnen Schritte einer oxidativen DNA-Spaltung am C4-Atom der Ribose dargestellt. Über mehrere Zwischenstufen fragmentiert schließlich der Zucker unter Bruch des DNA-Stranges. Um zu überprüfen, ob ein Naphthoxylradikal an der Plasmidspaltung beteiligt ist, wurden die Plasmidspaltungen zum einen unter sauerstofffreien Bedingungen und zum anderen in einer sauerstoffangereicherten Atmosphäre durchgeführt (Vorschrift 8.5.2).

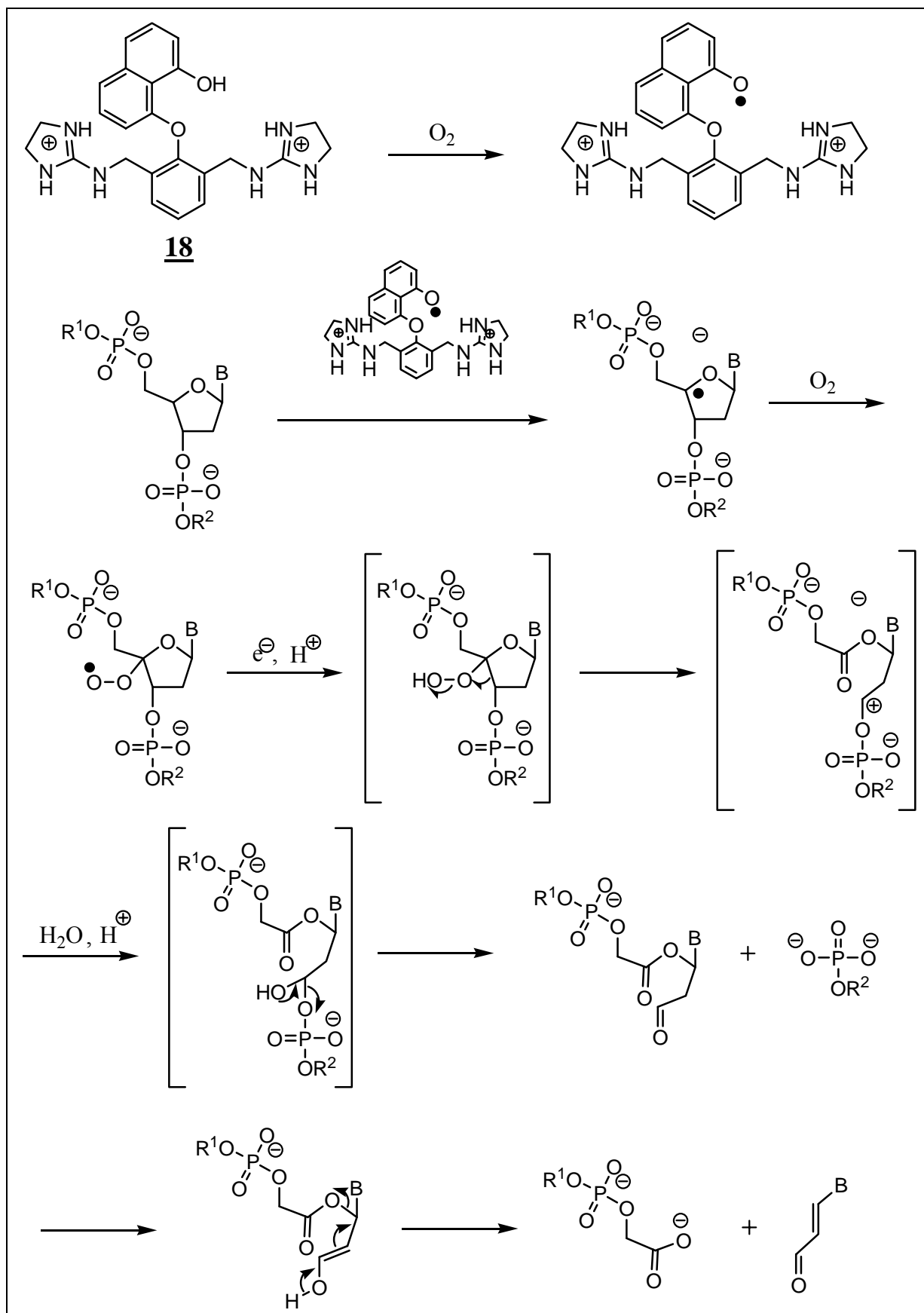


Abb. 27: Ein denkbarer Weg zur radikalinduzierter Spaltung von DNA, ausgehend von einem durch Oxidation von **18** gebildeten Naphthoxyradikal.

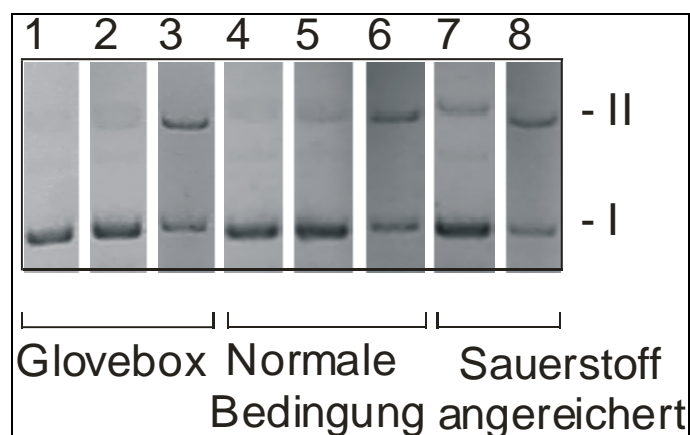


Abb. 28: Plasmidspaltung mit Bis(guanidinium)naphthol **18** in der Glovebox.

Tabelle 12: prozentuale Anteile an Form II der plasmidischen DNA, der in der Abb. 25 gezeigten Plasmidgels.

Bahn	Versuchsbedingungen	Form II [%]
1	Kontrolle 0 h	n. b.
2	Kontrolle 24 h	7.3
3	Inkubation: mit 18	40.8
4	Normale Kontrolle: 0 h	8.8
5	Normale Kontrolle: 24 h	13.6
6	Normale Inkubation: mit 18	35.0
7	O ₂ angereicherte Kontrolle: 24 h	14.6
8	O ₂ angereicherte Inkubation: mit 18	34.6

Bahn 3 in der Abb. 28 zeigt die Plasmidspaltung von Bis(guanidinium)naphthol **18** unter Sauerstoffausschluss. Bahn 6 zeigt die Plasmidspaltung von Bis(guanidinium)naphthol **18** unter normalen Bedingungen und Bahn 8 die Plasmidspaltung von Bis(guanidinium)naphthol **18** in einer sauerstoffangereicherten Atmosphäre. Man sieht deutlich, daß die Plasmidspaltung einerseits auch unter Sauerstoffausschluss funktioniert, sich aber andererseits keine Erhöhung der Spalteffizienz durch Sauerstoffanreicherung einstellt. Daher liegt hier die Schlussfolgerung nahe, daß die Plasmidspaltung nicht nach einem radikalischen Mechanismus verläuft.

6.2.7. Hydrolytischer Mechanismus

Nimmt man an, daß die Spaltung der Phosphodiesterbindung nach einem hydrolytischen Mechanismus erfolgt, dann sollten sich die gebildeten Produkte (5'-phosphorylierte bzw. 3'-phosphorylierte, oder dephosphorylierte DNA, siehe Abb. 29) mit Hilfe einer Ligase wieder religieren lassen.⁴⁸ Aufgrund einer Lücke im DNA Strang stellt depurinierte DNA kein Substrat für die Ligase dar. Im idealen Fall befindet sich die Phosphatgruppe am 5'-Ende und die Hydroxylgruppe am 3'-Ende. Das würde dem natürlichen Substrat für die T4 DNA-Ligase entsprechen, und eine direkte Ligationsreaktion wäre möglich. Hinterlässt der Katalysator hingegen ein gänzlich dephosphoryliertes Produkt, kann die Ligation nur nach Phosphorylierung der 5'-OH Gruppe mit der Polynukleotidkinase erfolgen. Liegt jedoch die Phosphatgruppe am 3'-Ende und die Hydroxylgruppe am 5'-Ende vor, lässt sich die Ligation nur nach Entfernen der Phosphatgruppe durch alkalische Phosphatase und anschließende Phosphorylierung der 5'-OH Gruppe mit Polynukleotidkinase durchführen. Durch Kombination der verschiedenen Enzymansätze können daher Aussagen über den Mechanismus getroffen werden. Um sicher zu stellen, daß die Bisguanidiniumalkohole keinen Einfluss auf die genannten Enzymreaktionen nehmen, musste zunächst ein Kontrollsystem zur Beurteilung der experimentellen Daten etabliert werden. Enzymatisch genickte Plasmid DNA ist nur mit solchen Restriktionsenzymen zugänglich, die die beiden DNA-Strangbrüche aufeinander folgend einführen, wie z.B. EcoRI. Die Gegenwart von Ethidiumbromid schafft Bedingungen, unter denen die Halbwertszeit des Intermediats (Form II DNA) verlängert wird und trägt dadurch zu einer Anreicherung der genickten DNA im Enzymansatz bei. Unterzieht man die so gewonnene Form II DNA einer Re-Ligationsreaktion, ist es unmöglich das Ligationsprodukt analytisch von der genickten DNA zu unterscheiden. Der Zusatz von Ethidiumbromid zum Re-Ligationsansatz bedingt die Wiederherstellung der Superhelizität des Ligationsprodukts. Damit ist die Unterscheidung von der genickten DNA gewährleistet.⁴⁷

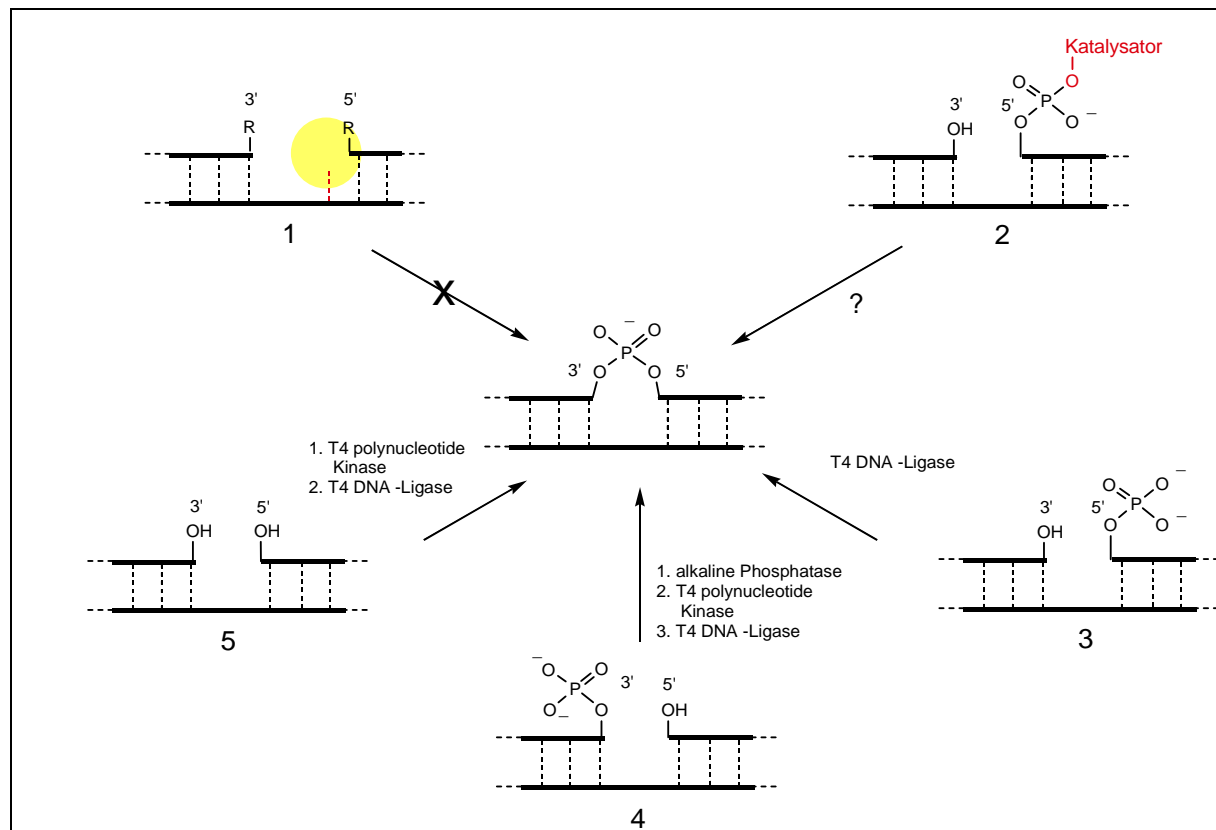


Abb. 29: Mögliche Methoden, um die in der Abbildung 26 gezeigte gesplattene DNA wieder zu ligieren.

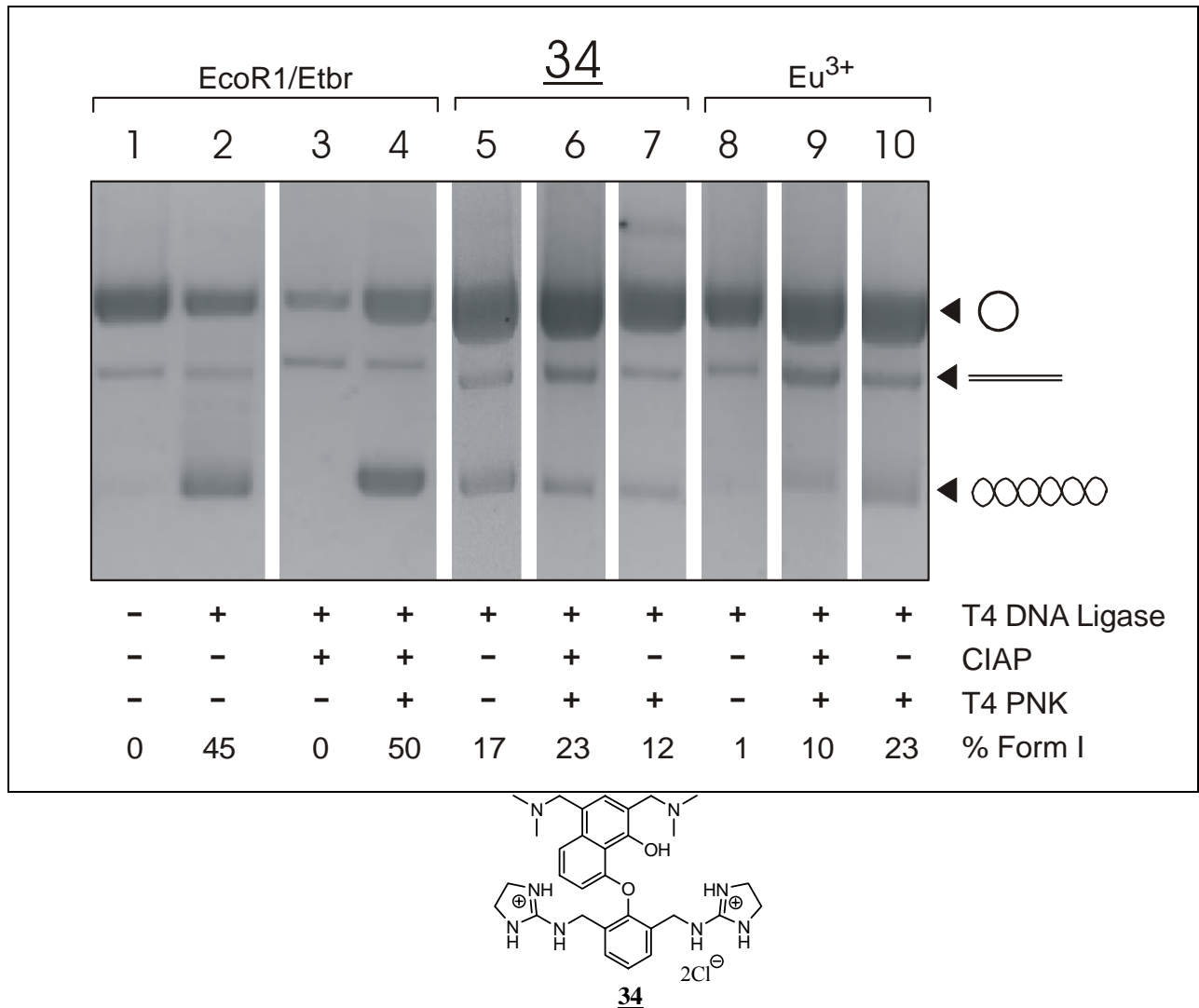


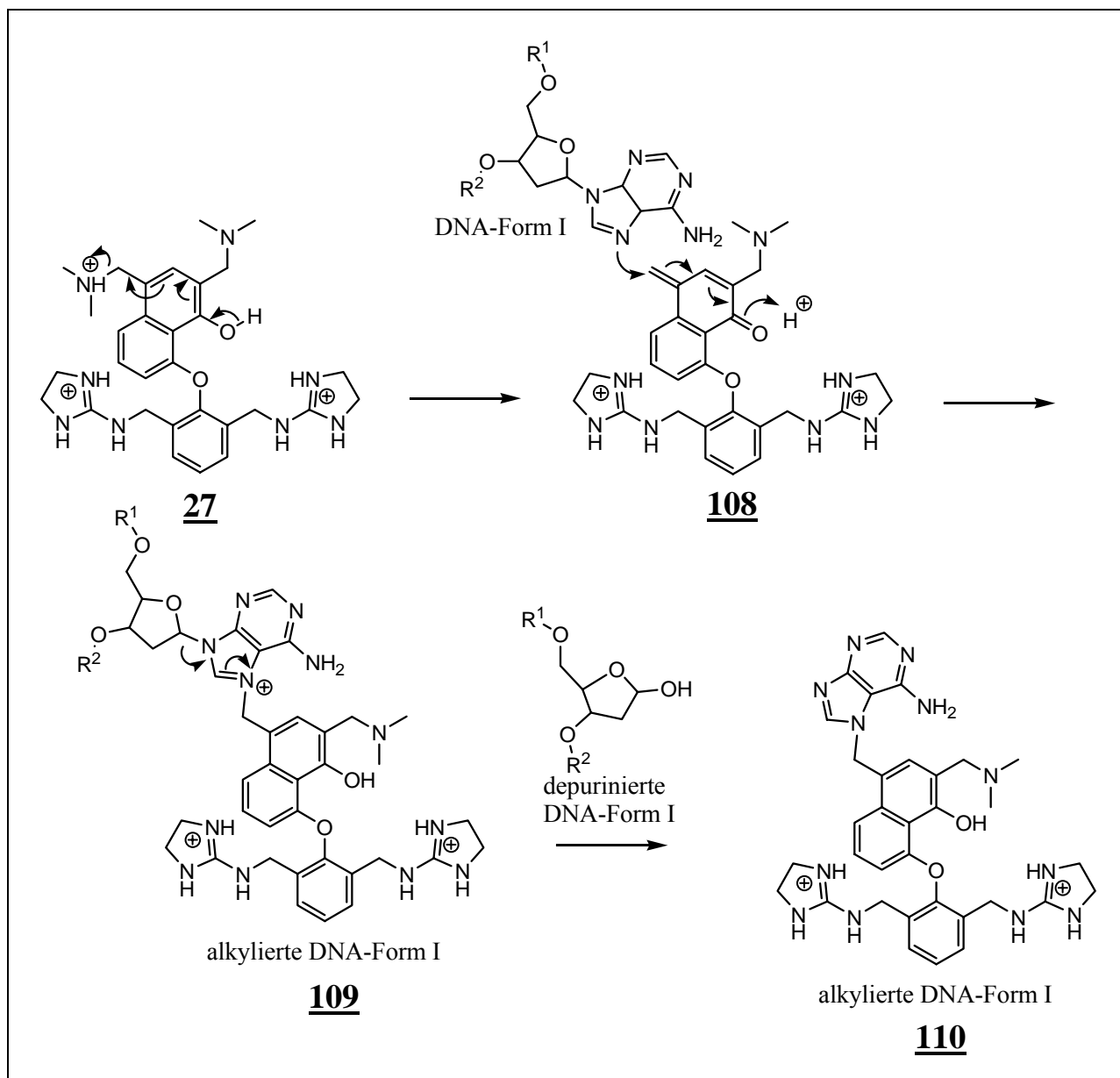
Abb. 30: Re-Ligation der Form II DNA.

Bevor die mit EcoRI/Ethidiumbromid (EcoRI/Etbr) bzw. Bis(mannich)naphthol **34** inkubierte DNA für Re-Ligationsreaktionen eingesetzt werden konnte, musste die Form II DNA von nicht umgesetzter Form I DNA abgetrennt werden. Dazu trennte man den Reaktionsansatz in einem präparativen Agarosegel auf. Nach Ausschneiden der Form II DNA Bande konnte die DNA mittels eines Gel-Extraktionskits (Qiagen) aus dem Agaroseblock isoliert werden. Die Form II DNA Proben wurden in Gegenwart von Ethidiumbromid für 16 h bei +16 °C religiert (Vorschrift 8.5.5). Die enzymatisch genickte DNA (5'-Phosphat, 3'-OH) lässt sich unter den gewählten Bedingungen für die T4 DNA Ligase zu 45% (Abb. 30, Bahn 2) wieder in die Form I DNA überführen. Nach der Abspaltung des 5'-Phosphatrests (5'-OH, 3'-OH) durch die alkalische Phosphatase (CIAP) ist keine Ligation mehr möglich (Bahn 3). Erst nach anschließender Phosphorylierung (PNK) kann die DNA (5'-Phosphat, 3'-OH) wieder ligiert

werden (Bahn 4). Auch in diesem Fall wurden 50% Form I DNA erhalten. Durch Bis(mannich)naphthol **34** gespaltene Form I DNA wurde nun ebenfalls den verschiedenen Enzymreaktionen unterzogen. Direkte Ligation mit T4 DNA Ligase (Bahn 5), Vorbehandlung mit Polynukleotidkinase (Bahn 7) bzw. Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase und anschließender Kinasierung mit PNK (Bahn 6) ergeben ein Religationsergebnis von etwa 20% Form I DNA. Die maximal erreichbare Ligationsrate liegt bei ca. 50% wie mit enzymatisch genickter DNA gezeigt werden konnte. Gemessen an diesem Ergebnis lässt sich die durch Bis(mannich)naphthol **34** genickte DNA etwa halb so gut religieren wie enzymatisch genickte DNA. Diese Daten liefern einen starken Hinweis auf einen hydrolytischen Mechanismus. Die nicht vollständig verlaufende Re-Ligation könnte sich darauf zurückführen lassen, daß ein beträchtlicher Anteil des Katalysators noch kovalent am 5'-Phosphat-Strang gebunden ist, und so eine Re-Ligation verhindert.

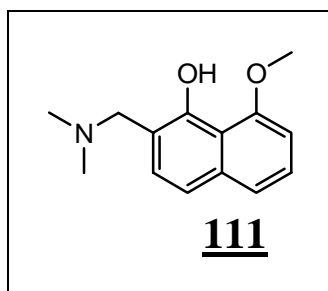
6.2.8 Versuche zur alkylierenden Depurinierung von Plasmid-DNA durch Bis(mannich)naphthol **34**

Es kann aus den vorangegangenen Ergebnissen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß die DNA-Spaltung durch Bis(mannich)verbindung **34** ausschließlich auf einem hydrolytischen Mechanismus basiert. Im ungünstigsten Fall könnte der Hydrolyse der DNA aber auch eine Depurinierungsreaktion überlagert sein. Bis(mannich)verbindungen können unter sauren Bedingungen einer Retromannichreaktion unterliegen (Schema 2).



Schema 3: Mechanismus der Depurinierung im Säuren zwischen dem Bis(mannich)naphthol **34** und der Adenosinbase eines plasmidischen DNA-Stranges.

Wie Schema 2 zeigte, können sich Bis(mannich)verbindungen im Säuren durch Eliminierungsreaktionen zu sehr reaktiven Chinomethiden umsetzen. Dabei kann im Säuren aus Bis(mannich)naphthol **34** das Chinomethid **108** entstehen (Schema 3). Dieses kann mit der Adenosinbase der DNA-Form I reagieren, und dabei könnte die instabile alkylierte DNA-Form I **109** entstehen. Diese würde sich unter Freisetzung der depurinierte DNA-Form I in Verbindung **110** umsetzen. Damit wäre das Plasmid dauerhaft verändert und könnte nicht mehr ligiert werden. Um den Reaktionsweg der Depurinierung auszuschließen, wurde das Mannichnaphthol **111** synthetisiert:



Diese Verbindung enthält nur das Nukleophil und eine Mannichbase in *Ortho*-Position zu der Hydroxygruppe. Denn wie bereits in Schema 3 aufgezeigt, ist für eine Depurinierungsreaktion im Gegensatz zur Hydrolyse des Bisguanidiniumgerüsts **94** nicht notwendig.

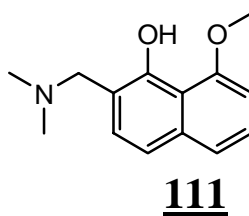
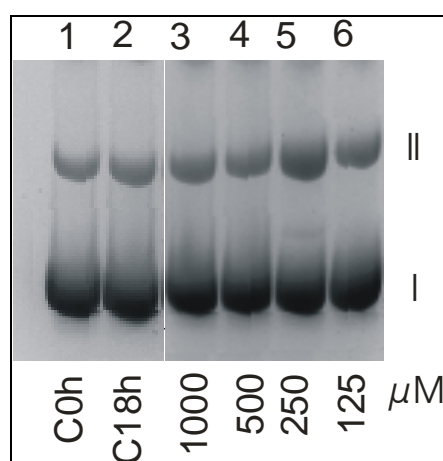


Abb. 31: Plasmidspaltung mit Mannichnaphthol **111**.

Tabelle 13: prozentuale Anteile von Form II, der in der Abb. 28 gezeigten Plasmidgels.

Zeit (h)	Konz. [μM]	Form II [%]
0	Kontrolle	12.7
24	Kontrolle	13.2
22	1000	15.3
22	500	14.1
22	250	24.2
22	125	17.4

In Tabelle 13 sind Plasmidspaltungen durch Mannichnaphthol **111** der Abbildung 31 dargestellt. Man sieht deutlich, daß unter Berücksichtigung der Hintergrundspaltung (0 h und 24 h Kontrolle) das Mannichdiol **111** eine gewisse Reaktivität gegenüber der Plasmid DNA besitzt. Doch wegen der schlechte Plasmidqualität (0 h Kontrolle zeigt 12.7 % Form II) ist dieses Experiment wenig aussagekräftig. Aus diesem Grund muss dieses Experiment mit reinerer Plasmid dringend wiederholt werden. Aber trotzdem gibt es ein Hinweis darauf, daß die Depurinierung keine grosse Rolle bei der Plasmidspaltung spielt.

6.2.9 Kovalente Bindung von Bis(mannich)naphthol **34** an 5'-Phosphat

6.2.9.1 Stabilität der O-Phosphat-Bindung

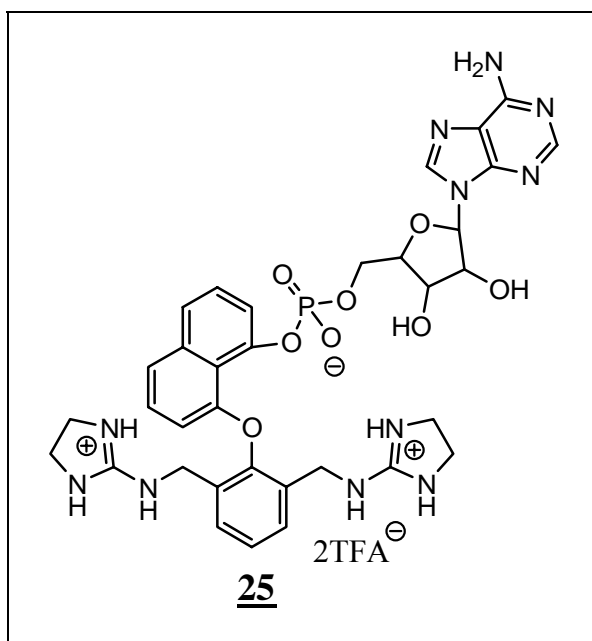


Abb. 32: Verbindungen **25**, zur Durchführung mechanistischen Studien.

Wie in Abb. 26 gezeigt wurde, kann das Bis(mannich)naphthol **34** nach der Plasmidspaltung noch kovalent an den 5'-Phosphatstrang (Abb. 24) gebunden sein. Das Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** (Abb. 32) wurde synthetisiert, um Hinweise auf die Stabilität der Bindung zwischen dem Katalysator und der DNA zu erhalten. Dabei wurde die Stabilität vom Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** bei 30 °C und 37 °C in wässr. Lösungen (10 mM in Trispuffer: pH 8, pH 9, pH 10, pH 11) über mehrere Wochen per reversed phase HPLC verfolgt. Unten sind nur ausgewählte Elutionsprofile des Stabilitätstests von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** gezeigt.

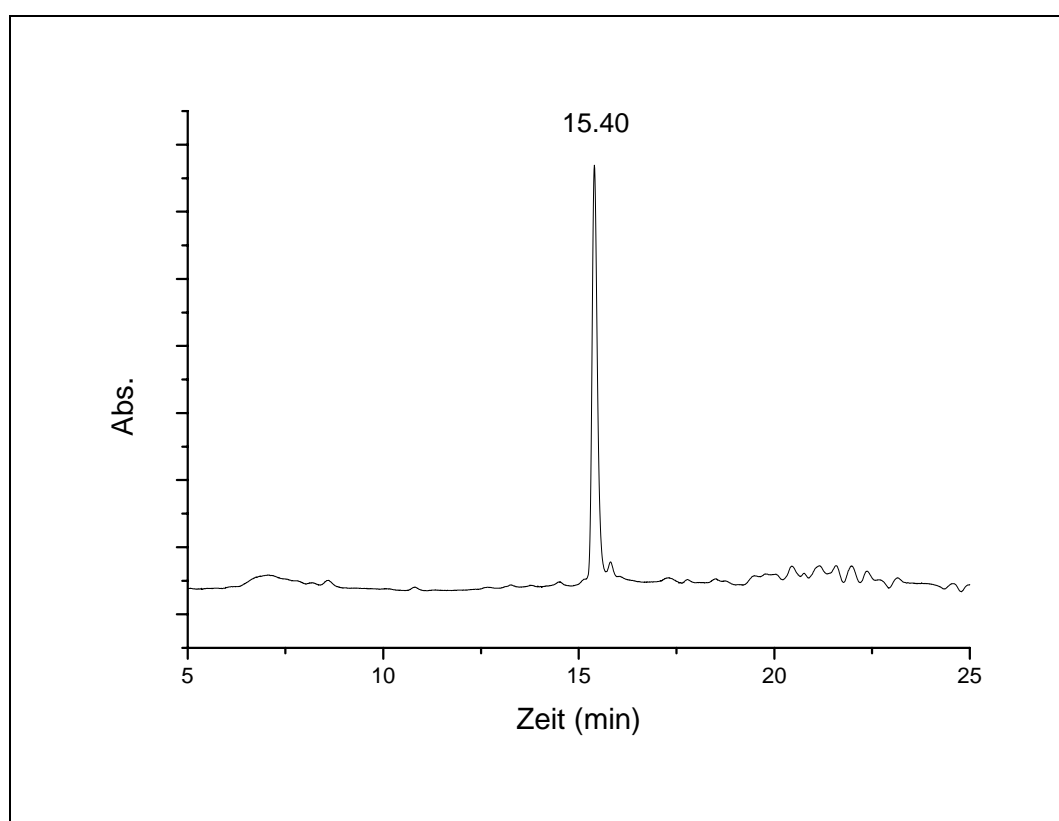


Abb. 33: Elutionsprofil von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** (15.40 min) vor der Reaktion.

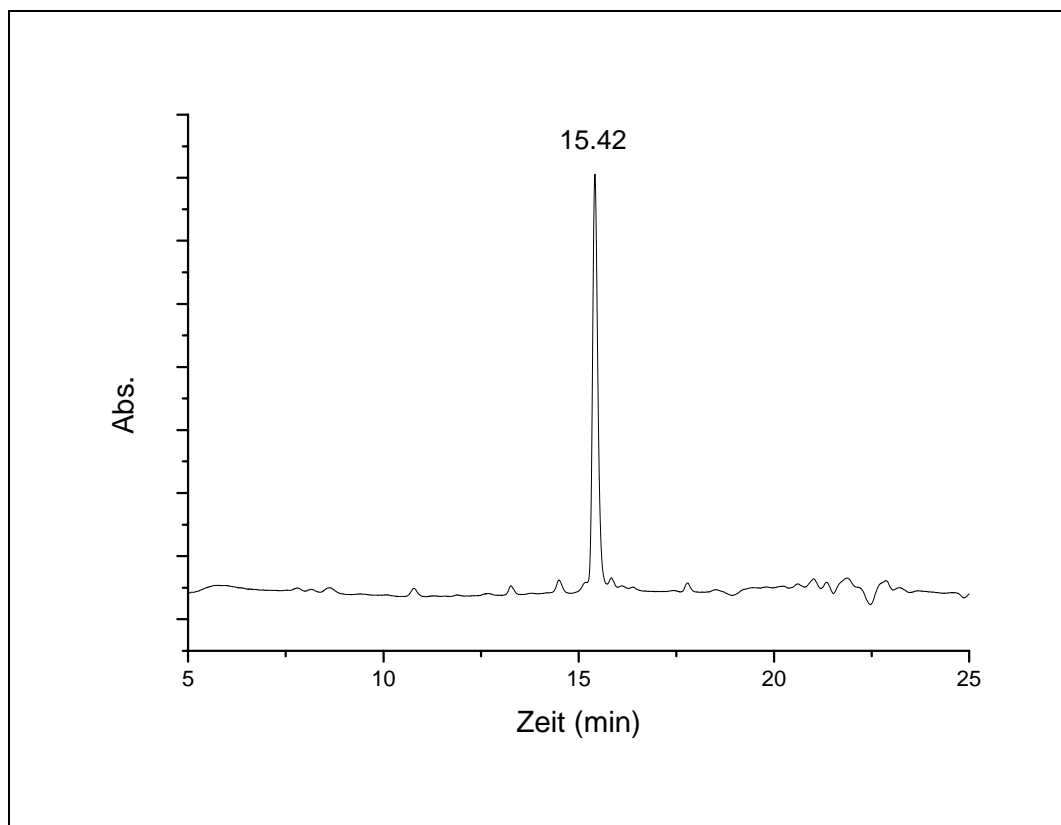


Abb. 34: Elutionsprofil von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol 25 (15.42) in 10 mM Trispuffer pH 8 und 37 °C nach 3 Wochen.

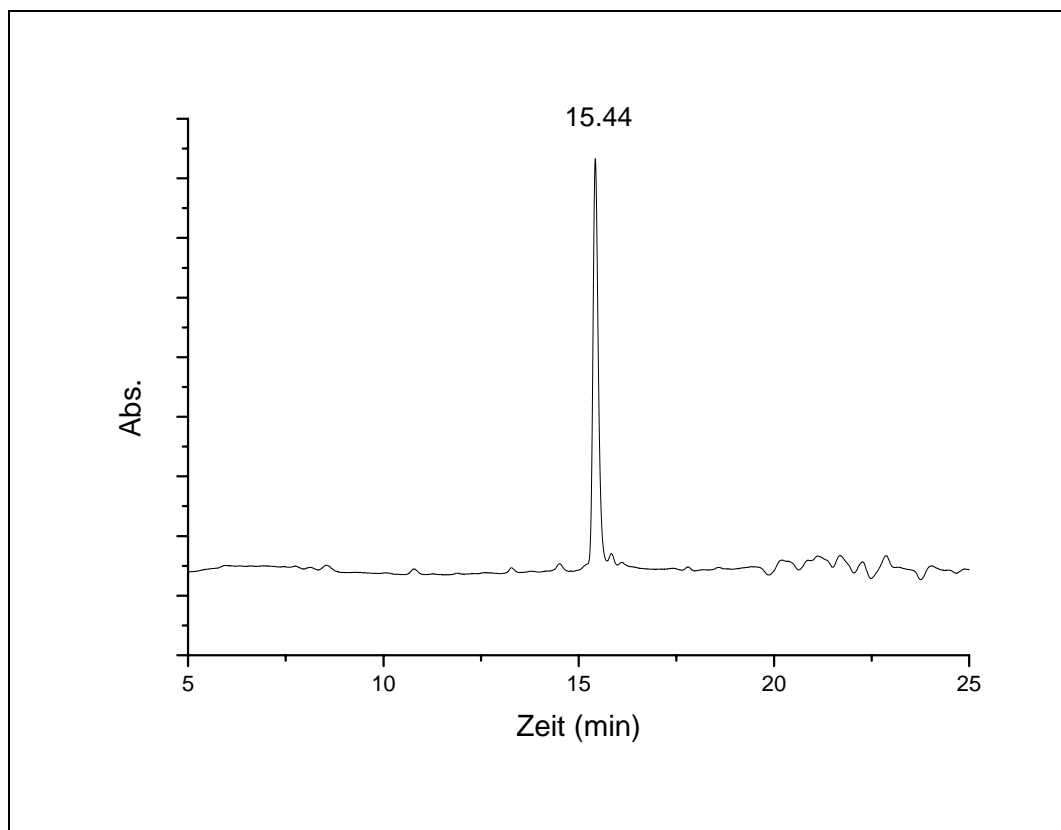
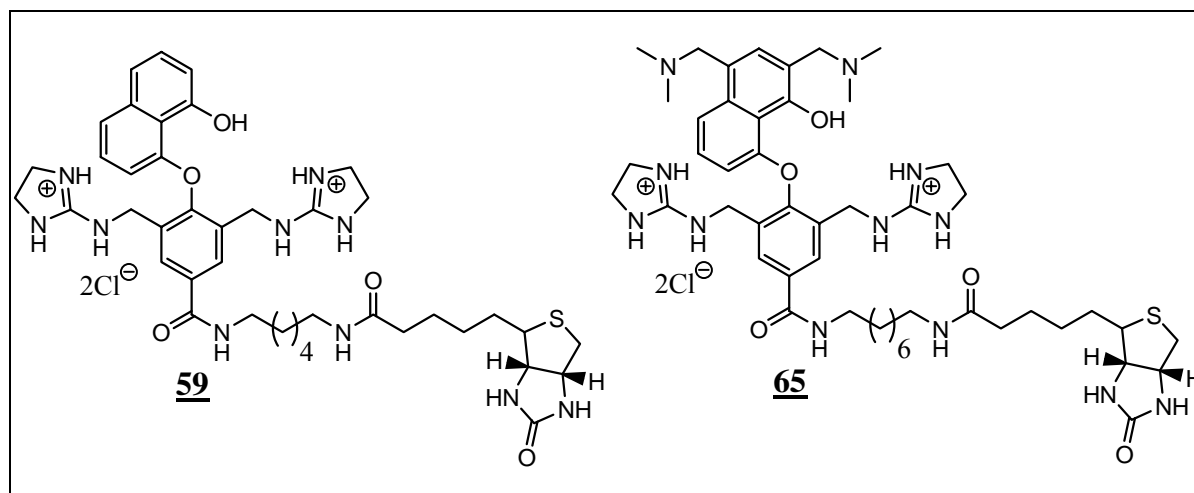


Abb. 35: Elutionsprofil von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol 25 (15.44 min) in 10 mM Trispuffer pH 11 und 37 °C nach 3 Wochen.

Abb. 33 zeigt das Elutionsprofil von Nucleotid-Bis(guanidinium)naphthol **25** vor dem Stabilitätstest. Man sieht in Abb. 34 und 35 deutlich, daß Verbindung **25** über weiten pH-Bereich und längeren Reaktionszeiten in wässrigen Lösungen stabil ist. Die Elutionsprofile von **25** bei anderen pH-Werten und Temperatur sahen nicht viel anders aus. Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, daß die Bindung zwischen dem Katalysator und DNA ziemlich stabil sein kann und damit ein Spaltprodukt 2 bei der Plasmidspaltung (Abb. 26) denkbar ist.

6.2.10 Versuche zum Nachweis kovalenter Bindungen von biotingelabetem Bis(mannich)naphthol **65** an DNA



Da sich das unvollständige Ligationsergebnis auch nicht auf eine Depurinierung zurückführen lässt, soll hier auf die Möglichkeit eingegangen werden, daß die Re-Ligation durch noch kovalent am 5'-oder 3'-Phosphatstrang gebundenes Bis(mannich)naphthol **34** verhindert wird. Um den kovalent an die DNA gebundenen Katalysator nachweisen zu können, wurde für eine erste Studie das Bis(guanidinium)naphthol **59** und später das Bis(mannich)naphthol **65** mit einem Biotinrest synthetisiert. Das Biotin lässt sich mit Hilfe eines Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugats nachweisen.

Bevor die Biotinverbindungen für Blotting-Experimente eingesetzt werden konnten, wurden zunächst Plasmidspaltungen mit dem Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** und dem Biotin-

Bis(mannich)naphthol **65** durchgeführt (Vorschrift 8.5.2). Hier stellte sich heraus, daß beide Verbindungen genau so reaktiv sind, wie die jeweiligen Grundverbindungen. Mit dem Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** konnten nun erste Blotting Experimente vorgenommen werden. Die mit 5 mM Verbindung **59** inkubierte DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels Kapillartransfer auf eine Nylon-Membran transferiert. Falls das Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** kovalent an die DNA gebunden hat, kann nun das Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugat an das Biotin binden. Die Detektion erfolgt über eine Farbreaktion mit einem geeigneten Substrat für die Alkalische Phosphatase. In Abbildung 36 A ist ein Ethidium-gefärbtes Agarosegel und der dazugehörige Blot gezeigt (Doppelbestimmung). Es fällt auf, daß auf der Blotting-Membran eine intensive Hintergrundfärbung erkennbar ist. Eine Erklärung für die Hintergrundfärbung konnte schnell ermittelt werden. Da das Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** nicht aus dem Spaltansatz entfernt wurde, fand eine Bindung über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran statt. Für alle nachfolgenden Blotting Experimente mußte daher die Substanz vor der Auftragung auf das Agarosegel abgetrennt werden. Das Problem bestand in der Abtrennung einer kationischen Verbindung von der anionischen DNA. Als Methode wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt. Die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Abtrennversuche sind in Abbildung 36 B (jeweils das Ethidium-gefärbte Agarosegel und der dazugehörige Blot) gezeigt. In Bahn 1 befindet sich die unbehandelte Kontrolle. Hier zeigt sich auf dem Blot wieder die intensive Hintergrundfärbung. Die Proben der Bahnen 2-5 wurden einer Ionenaustauschchromatographie an Dowex (Na⁺-Form) Harz (Bahnen 2-4: Säulenverfahren; Bahn 5: Batch-Verfahren) unterzogen. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel mußten die Proben einkonzentriert werden. Hier wurden verschiedene Ansätze gewählt: Bahn 2: Probe nach Ultrafiltration (Microcon YM-3, Millipore) und Bahnen 3 und 4: Ethanolfällung. In allen Proben in denen das Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** mittels Ionenaustauschchromatographie abgetrennt wurde, ist keine Hintergrundfärbung mehr zu verzeichnen. Leider stellte sich auch der gewünschte Effekt nicht ein, daß nur noch die Form II DNA Bande angefärbt wird. Ob sich die Anfärbung der Form I DNA Bande auf nicht vollständig abgetrenntes Biotin-Bis(guanidinium)naphthol **59** zurückführen läßt konnte nicht ausgeschlossen werden. Einen eindeutigen Nachweis hierfür liefern die experimentellen Daten jedoch auch nicht. Aufschluß über dieses Phänomen sollten die Blotting Versuche mit Biotin-Bis(mannich)naphthol **65** ergeben. Zum einen bietet diese Verbindung den Vorteil, daß sie die Plasmid DNA wesentlich effizienter spaltet (**Faktor 50** gegenüber Verbindung **59**) und zum anderen verfügt Verbindung **65** über zusätzliche

positive Ladungen die die Abtrennung mittels Ionenaustauschchromatographie dramatisch verbessern sollte.

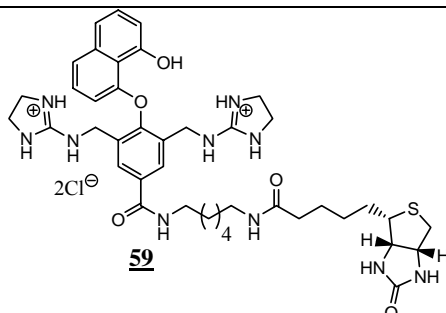
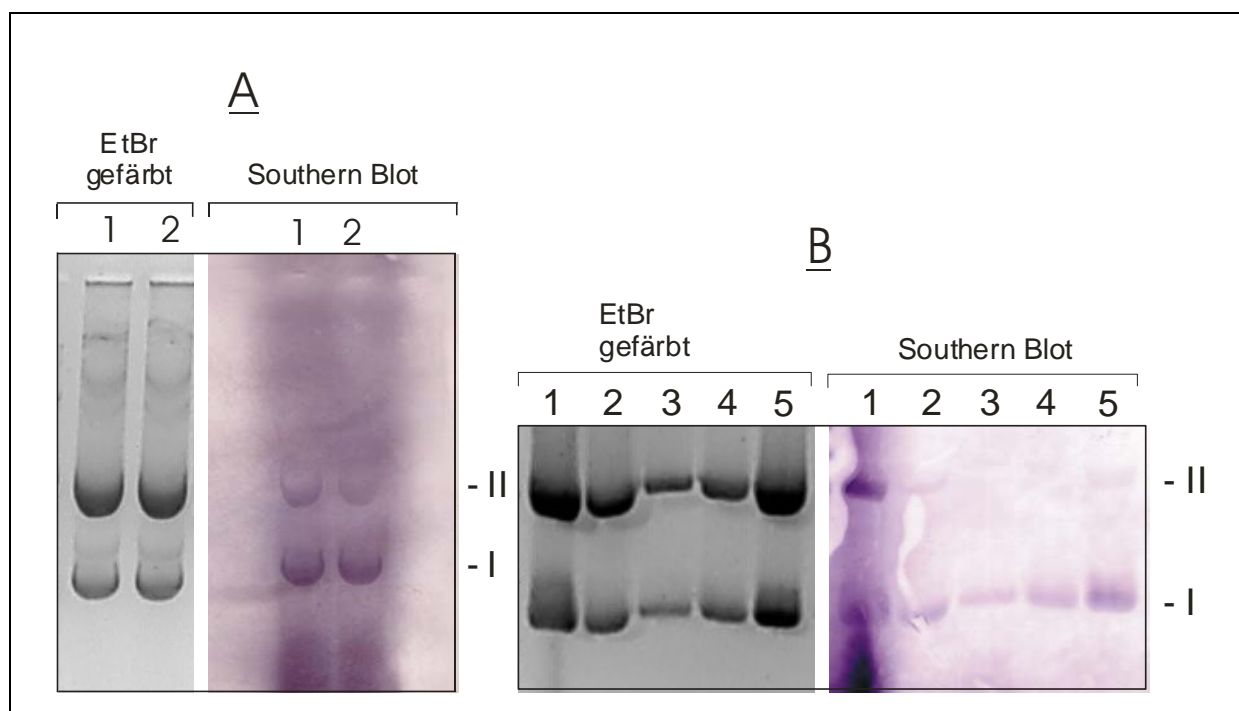
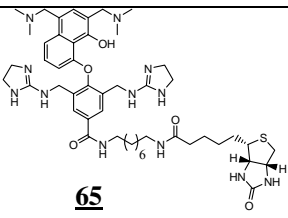


Abb. 36: Plasmidspaltungen mit Bis(guanidinium)naphthol **59**.

Zunächst wurde die Spaltung des Plasmids mit dem Biotin-Bis(mannich)naphthol **65** durchgeführt (Kapitel 8.5.2), um festzustellen, ob diese Verbindung genau so reaktiv war, wie das Bis(mannich)naphthol **34**.

Tabelle 14: Durch modifiziertem Bis(mannich)naphthol **65** gespalte prozentuale Anteile von Form II.

	Konz [μ M]	Form II [%]
Kontrolle 0 h	n. b.	n. b.
Kontrolle 24 h	3.4	3.4
 65	630	24.3
	310	24.6
	160	42.3
	80	13.6

Man erkennt in Tabelle 14, daß bei niedrigen Konzentrationen das biotینگelabelte Bis(mannich)naphthol **65** die erwartete Plasmidspaltung zeigt. Die Reaktivität ist mit der vom Bis(mannich)naphthol **34** vergleichbar. Damit kann man mit dieser Verbindung die nächsten Experimente durchführen, um den Mechanismus der Plasmidspaltung nachzuweisen (Weitere Versuche konnten aus Zeitgründen nicht mehr im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt werden).

6.2.11 Einfluss der Guanidiniumreste auf die Reaktivität der Bis(guanidinium)naphthole

Um den Einfluss der Guanidiniumreste auf die Reaktivität der Bis(guanidinium)alkoholen gegenüber den Plasmiden nachzuweisen, wurden das Bis(amino)naphthol **19** und das entschützte Bis(aminomannich)naphthol **30** getestet. Denn diese Verbindungen sind die Aminoanaloga zu den reaktiven Bis(guanidinium)naphthol **18** und Bis(mannich)naphthol **34**. Dabei wurden die Plasmidspaltungen von pUC19 mit Bis(amino)naphthol **19** und Bis(aminomannich)naphthol **23** nach der Vorschrift 8.5.2 in 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) bei 37°C für 18 h durchgeführt.

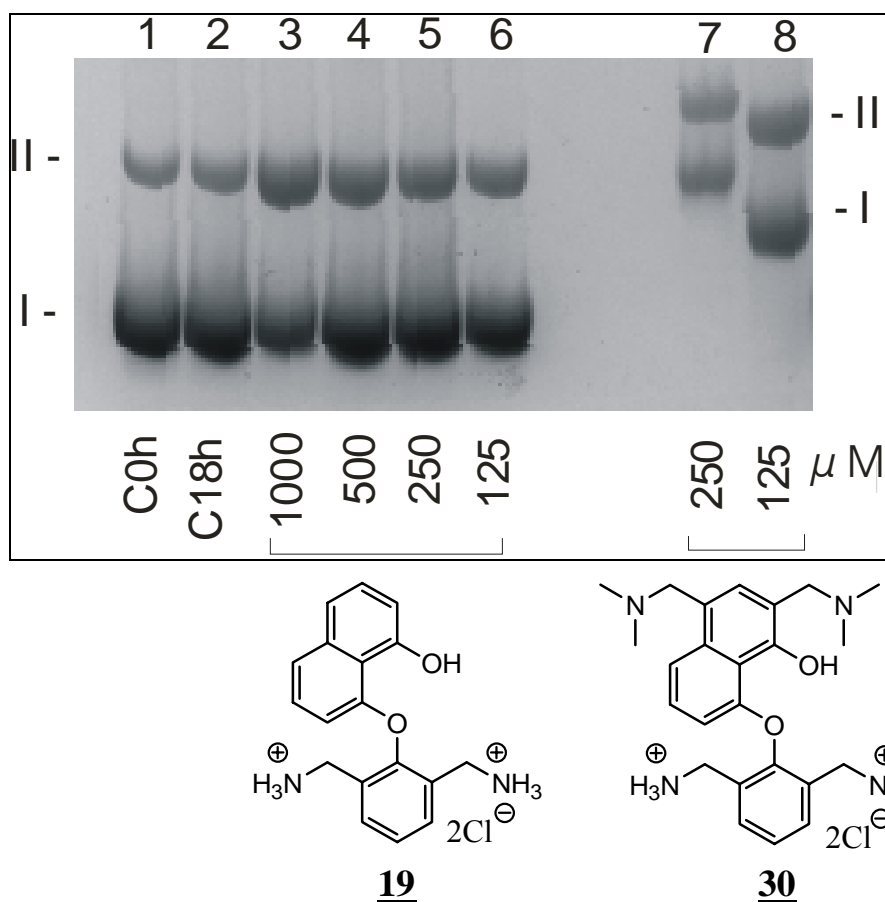


Abb. 37: Plasmidspaltung von Bis(amino)naphthol **19** und entschützte Bis(amniomannich)naphthol **30**.

Bei der Bahn 3 bis Bahn 6 in der Abb. 37 handelt es sich um die Plasmidspaltung von Bis(amino)naphthol **19** mit abnehmender Konzentration. Bei der Bahn 7 und 8 um die Plasmidspaltung durch Bis(amniomannich)naphthol **30**. Dabei sind die Form I und II stark geshiftet.

Tabelle 15: : prozentuale Anteile von Form II, der in der Abb. 37 gezeigten Plasmidgels.

	Konz [μM]	% Form II
Kontrolle 0 h	12.7	12.7
Kontrolle 18 h	13.2	13.2
19	1000	17.4
	500	7.5
	250	4.4
	125	7.1
30	250	21.6
	125	11.3

Man sieht in der Tabelle 15 deutlich, daß das Bis(aminomannich) **30** ein Plasmid besser spaltet, als das Bis(amino)naphthol **19**. Das ist im Einklang mit den Guanidiniumanaloga **18** und **34** (Tabelle 12). Doch wie erwartet, spalten die Aminoverbindungen **19** und **30** nicht so gut, wie ihre Guanidiniumanaloga **19** und **34**. Das deutet daraufhin, daß die Guanidiniumreste einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktivität der biskationischen Alkohole haben. Daß die Aminoverbindungen **19** und **30** überhaupt Plasmid spalten,⁵² könnte daran liegen, daß die Aminoreste in wässriger Lösung überwiegend protoniert vorliegen und somit als generelle Basen (Kapitel 2) die Reaktion katalysieren. Doch wegen der schlechten Plasmidqualität muss dieses Experiment mit reinerer Plasmid dringend wiederholt werden

7. Zusammenfassung und Ausblick

Für die Entwicklung von Enzymmimetika der Staphylokokkennuclease¹⁸ und Topoisomerase⁵ wurden in unserer Arbeitsgruppe zuerst von M. Muche⁶ (Verbindungen der ersten Generation, Kapitel 2.2.1) die ersten reaktiven Bis(guanidinium)alkohole synthetisiert. Von A. Büsing⁷ wurden diese Bis(guanidinium)alkohole (Verbindungen der zweiten Generation, Kapitel 2.2.2) bezüglich der Reaktivität gegenüber Modells substraten wie Catecholcyclophosphat **4**, 2,4-BDNPP **5** und 4-BNPP **9** ($k_{\text{obs}} = 6.0 \times 10^{-5}$) unter basischen, nicht protischen Bedingungen, weiter verbessert. Doch bei der Reaktion mit den Modells substraten entstanden neben den gewünschten O-Phosphaten auch N-Phosphate.

Mit dem in meiner Diplomarbeit⁸ synthetisierten Bis(guanidinium)naphthol **18** wurde nicht nur die Reaktivität mit 2,4-BDNPP **5** und 4-BNPP **9** in basischen, nicht protischen Bedingungen, gegenüber dem Phenanthren **8** weiter erhöht, sondern es entstanden auch ausschließlich die gewünschten O-Phosphate. Mit 4-BNPP **9** als Substrat wurde eine Geschwindigkeitskonstante von 2.2×10^{-4} 1/min gemessen. Selbst in DMF/H₂O (2:1) und pH 11.7 zeigte **18** mit 4-BNPP **9** ($k_{\text{obs}} = 6.98 \times 10^{-7}$) eine Aktivität. Auch mit dem am wenigsten reaktiven Modells substrat 4-MNPP **91** zeigte das Bis(guanidinium)naphthol **18** eine Umsetzung. Was besonders bemerkenswert erschien, ist daß man mit dem Bis(guanidinium)naphthol **18** nicht nur Modellphosphate spalten konnte, sondern auch Plasmid DNA, und das sogar in mikromolaren Konzentrationsbereichen, wo normalerweise

Metallionen enthaltende Komplexe aktiv sind.⁴⁰ Die Spalteffizienz von **18** war mit der des Phenanthrens **8** vergleichbar.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Bis(mannich)naphthol **34** wurde nicht nur die Reaktivität mit 2,4-BDNPP **5** ($k_{\text{obs}} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ 1/min}$) in neutralen, protischen Bedingungen gegenüber dem Bis(guanidinium)naphthol **18** ($k_{\text{obs}} = 6.4 \times 10^{-4} \text{ 1/min}$) um den **Faktor 2,6** verbessert, sondern auch die Spaltfähigkeit gegenüber Plasmid DNA um **Faktor 50** erhöht. Anschließend wurden ausführliche mechanistische Studien zum Nachweis eines hydrolytischen Mechanismus der Plasmidspaltung durchgeführt. Um zu überprüfen, ob ein Naphthoxylradikal an der Plasmidspaltung beteiligt ist (Kapitel 6.2.6, Abb. 27), erfolgten die Plasmidspaltungen mit Bis(guanidinium)naphthol **18** unter sauerstofffreien Bedingungen. Die erfolgreiche Plasmidspaltung unter O₂-Ausschluss legte die Schlussfolgerung nahe, daß die Plasmidspaltung nicht nach einem radikalischen Mechanismus verläuft. Wenn die Spaltung der Phosphodiesterbindung nach einem hydrolytischen Mechanismus erfolgt, dann sollten sich die gebildeten Produkte (5'-phosphorylierte, 3'-phosphorylierte, bzw. dephosphorylierte DNA, siehe Kapitel 6.2.7, Abb. 29) mit Hilfe einer Ligase wieder religieren lassen. Da sich jedoch nur ein kleiner Teil der Form II DNA wieder ligieren ließ, liefern diese Daten nur einen starken Hinweis auf einen hydrolytischen Mechanismus. Weil der Hydrolyse der Plasmid DNA auch eine alkylierende Depurinierungsreaktion überlagert sein kann (Kapitel 6.2.8, Schema 3), wurden Plasmidspaltungen mit Mannichnaphthol **111** durchgeführt. Da dieses keine signifikante Plasmidspaltung zeigte, kann man die Depurinierung der Plasmid DNA als Hauptmechanismus ausschließen. Es ist auch denkbar, daß ein beträchtlicher Anteil des Katalysators noch kovalent am 3'- oder 5'-Phosphat-Strang gebunden ist, und so eine Re-Ligation verhindert. Um den kovalent an die DNA gebundenen Katalysator nachweisen zu können, wurden Bis(guanidinium)naphthol **59** und Bis(mannich)naphthol **65** mit einem Biotinrest synthetisiert. Daß sich das Biotin mit Hilfe des Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugats elegant visualisieren, wurden mit den ersten Blottingexperimenten bestätigt. Doch der Katalysator war hauptsächlich mit Form I DNA assoziiert. Aus den Ergebnissen aller Versuche kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß bei der Plasmidspaltung durch das Bis(mannich)naphthol **34**, mehrere Mechanismen überlagert sind. Dabei könnte es sich um Hydrolyse, Depurinierung, kovalent an 5'-Phosphatstrang gebundenes Bis(mannich)naphthol **34** und noch unbekannte Mechanismen handeln. Weitergehende Experimente mit dem Biotin-Bis(mannich)naphthol **25** könnten weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Plasmidspaltung liefern.

Daraus ergibt sich als Ziel für die biskationischen Naphthole der nächsten Generation, ihre Reaktivität so zu erhöhen, daß sie auch lineare DNA mit guten Ausbeuten spalten können. Dies kann man dadurch erreichen, daß man zwei Bis(mannich)verbindungen über einen geeigneten Linker miteinander verbindet. Daß diese Verbindungsklasse zugänglich ist, konnte bereits durch die Synthese von Di-bis(guanidinium)naphthol **90** gezeigt werden. Bei dieser Verbindung braucht man nur noch die Mannichbasen im letzten Syntheseschritt einzuführen, um die gewünschte Zielverbindung **112** (Abb. 36) zu erhalten.

Eine andere Strategie für die Spaltung von linearer DNA lässt sich mit Naphtholverbindungen realisieren, die Metallionen enthalten. Denn aus der Literatur⁴¹ ist bekannt, daß solche Verbindungen auch in der Lage sind, lineare DNA in zehnmikromolaren Konzentrationsbereichen mit hoher Ausbeute zu spalten.

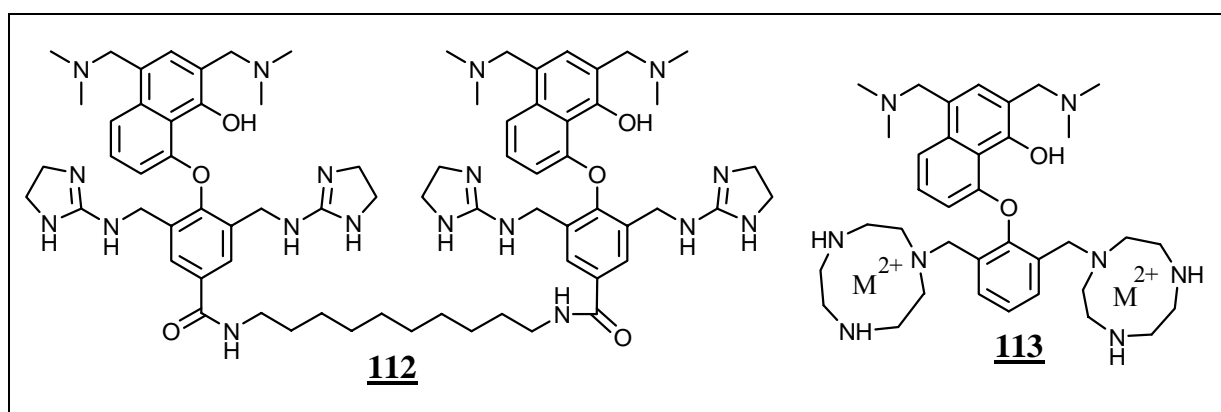


Abb. 36: Mögliche Syntheseziele für künstliche Enzyme der nächsten Generation.

Wenn Bismannich-Metallkomplex **113** lineare DNA mit hoher Ausbeute spaltet, dann könnte man diese Verbindung an PNA binden und dadurch selektiv lineare DNA spalten.⁵⁴

Neben der Möglichkeit, über PNA Konjugate eine selektive DNA Spaltung zu erzielen, können auch Pyrrol-Imidazolen-Konjugate^{55 56} eingesetzt werden. Denn man weiss exakt, wo sie an der linearen DNA binden. Aus der Spaltung der linearen DNA durch diese Pyrrol-Imidazolen-Konjugate, kann man Erkenntnisse über den Mechanismus der DNA-Spaltung gewinnen.⁵⁷

8. Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Wasserfreie Lösungsmittel erhielt man nach folgenden Verfahren: Tetrahydrofuran wurde von Natrium/Benzophenon, DMF im Vakuum von CaCl_2 und Diisopropylethylamin von CaH_2 unter einer Argonatmosphäre abdestilliert.

Schmelzpunkte (Schmp.): unkorrigiert, Heiztischmikroskop nach Kofler.

Dünnschichtchromatographie (DC): Fertigplastikfolien Kieselgel 60 F_{254} ; die Chromatogramme wurden unter einer Universal UV-Lampe von Konrad Benda oder durch Einwirkung von Färbereagenzien sichtbar gemacht:

1. Anfärben mit Cer-Lösung, hergestellt aus 2.0 g Phosphormolybdänsäure, 1.0 g Cer(IV)-sulfat und 10 ml konz. H_2SO_4 in 90 ml H_2O mit oder ohne anschließendem Erhitzen durch ein Heissluftgebläse. Naphthole färben bei RT rosa.
2. Anfärben mit Ninhydrin, bestehend aus 3.75 g Ninhydrin in einem Gemisch aus 25 ml n-Butanol und 25 ml Aceton, Amine färben sich nach dem Erwärmen rot, Guanidine dunkelrot.

Ultraviolett-spektroskopie (UV): Varian Cary 1E, die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe der Microsoft Windows[®] kompatiblen Software Cary Scan.

Infrarotspektroskopie (IR): Perkin Elmer 1600 Series, Plotter HP Color Pro. Die Intensität der Banden wurde mit s für sehr intensiv, m für mässig intensiv und w für wenig intensiv charakterisiert.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Bruker AM 250 (^1H -NMR: 250 MHz) und Bruker AMX 400 (^1H -NMR: 400 MHz); δ -Werte in ppm, Kopplungen (J) in Hertz, D_6 DMSO-Signal ($\delta = 2.49$). Die Feinstruktur der Signale wurde mit s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett und m für Multiplett angegeben.

Massenspektrometrie (MS): ESI: Fisons, VG Platform II, EI: Finningan 400.

Flashchromatographie: Kieselgel 60 (40-63 μm , 230-400 mesh) von Merck.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Analytisch: System Jasco mit UV-970 UV/VIS Detektor, PU-980 HPLC Pumpe, DG-980-50 Dreiwegeentgaser, LG-980-02 Gradientmischer und FP-920 Fluoreszenzdetektor. Die

Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Microsoft Windows[®] kompatiblen Software Borwin Version 1.22 von JMBS Developments.

Semipräparativ: Merck SepTech, mit Merck/Hitachi L₄₀₀₀A UV-Detektor und SepTech/Knauer präparativem RI-Detektor, Säulen 500 × 50 mm und 250 × 50 mm Innendurchmesser, gepackt mit Säulenfüllstand Merck NW₅₀, stationäre Phase Macherey und Nagel Nucleoprep 20 µm, Servogor SE₁₂₀ Zweikanalkompensationsschreiber.

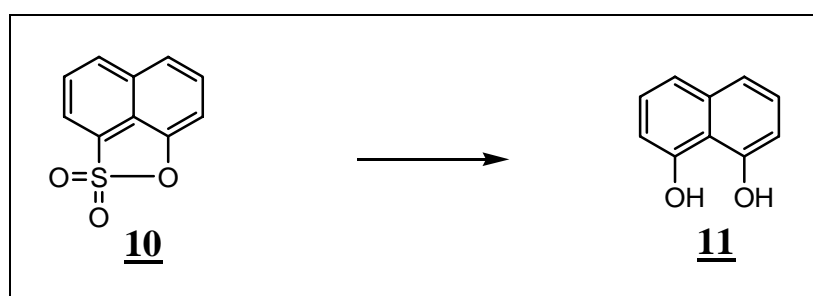
Elementaranalysen: wurden gemessen mit einem Gerät Heraeus CHN-Rapid.

Thermostat: Lauda RM6, Temperaturgenauigkeit ± 0.05°C.

Druckapparatur: Roth Laborautoklav Modell 1, Reaktionsvolumen 100 ml, max. Betriebsdruck 100 bar, max. Betriebstemperatur: 300°C

8.2.1 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 18

8.2.1.1 Synthese von Naphth-1,8-diol 11



In einem Dreihalskolben wurden 58.65 g KOH bei 242 °C geschmolzen und innerhalb von etwa 1 h 15 g (72.81 mmol) Naphthsulton 10 zugegeben. Bei der Zugabe von 10 entstand immer wieder ein weißer Nebel im Kolben. Nach der Zugabe von 10 wurde die dunkelgrüne Suspension für 1 h bei 242 °C gerührt, dann auf 90 °C abgekühlt, 150 ml dest. H₂O zugegeben und die dunkle Lösung für 1 h bei 90 °C weitergerührt. Anschließend wurde die Lösung auf

300 ml salzsaures Eiswasser gegossen und in einem Scheidetrichter zweimal mit 300 ml EtOAc ausgeschüttelt. Dann wurden die organischen Phasen vereinigt, über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 210 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:2) gereinigt. Der verbleibende Feststoff konnte aus EtOAc/Hex zu farblosen Nadeln kristallisiert werden.

Ausbeute: 7.0 g (59 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:1), $R_f = 0.55$

Schmp.: 145°C Lit.: $[145-146^\circ\text{C}]^{27}$

IR (KBr): 3897.0 m, 3888.5 m, 3877.9 m, 3860.4 m, 3849.7 m, 3834.8 m, 3812.9 m, 3798.0 m, 3776.0 m, 3764.3 m, 3747.9 m, 3741.7 m, 3730.7 m, 3707.6 m, 3685.8 m, 3672.5 m, 3666.4 m, 3645.5 m, 3625.6 m, 3615.9 m, 3583.9 m, 3563.7 m, 3142.3 w, 2615.9 m, 2350.5 m, 2046.5 s, 1908.8 s, 1828.0 s, 1754.1 s, 1731.7 s, 1713.1 s, 1639.9 m, 1613.5 w, 1585.3 w, 1522.8 m, 1505.9 s, 1464.1 w, 1409.1 w, 1376.8 w, 1321.2 m, 1157.7 m, 1111.8 s, 1071.6 s, 1031.9 w, 958.2 s, 874.8 s, 856.3 s, 812.2 w, 757.2 w, 746.8 w, 631.1 w, 622.2 m, 597.2 m

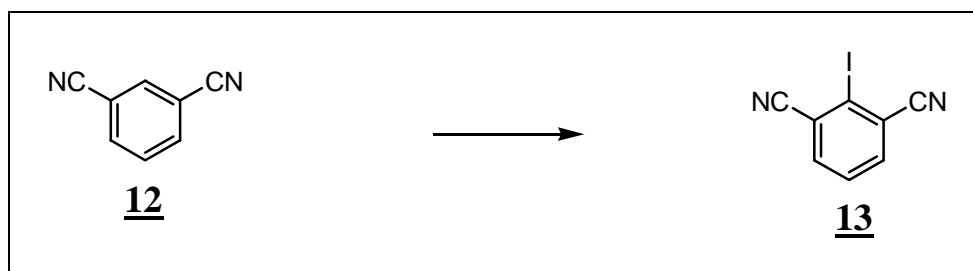
EA: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2$ (160.05)

Ber.: C 74.99, H 5.03

Gef.: C 74.93, H 5.10

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ CDCl_3 , 250 MHz); 6.82 (d, $J = 7.6$, 2H, 2-H, 8-H), 7.25 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 7.89 (s, 2H, 1-OH, 8-OH)

8.2.1.2 Synthese von 2-Iodisophthalnitril **13**



In einem Dreihalskolben wurden 5 g (39 mmol) Isophthalnitril **12** in 350 ml abs. THF gelöst und bei -80 °C in einer Argonatmosphäre 19.5 ml einer 2 M Lösung (39 mmol) von LDA in THF innerhalb von 10 min zugetropft. Dabei färbte sich die Lösung dunkelviolett. Nach 30 min wurden 4 g Iod, aufgelöst in 50 ml abs. THF, langsam zu der Reaktionslösung getropft. Hierbei färbte sich die Lösung braun. Nach 1 h wurde die Lösung auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 300 ml EtOAc gelöst und zweimal mit gesättigter Natriumthiosulfat ausgeschüttelt. Dann wurden die organische Phasen vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 200 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:1) gereinigt. Zuletzt konnte der verbleibende Feststoff aus EtOAc/Hex zu fast farblosen Nadeln kristallisiert werden.

Ausbeute: 8.0 g (81 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:1), $R_f = 0.7$

Schmp.: 208 °C Lit.: [208-209 °C]²⁸

IR (KBr): 1639.9 s, 1612.4 w, 1585.6 m, 1523.0 s, 1462.4 m, 1407.8 w, 1377.1 m, 1321.2 s, 1282.0 w, 1235.0 m, 1204.7 m, 1171.1 s, 958.2 s, 875.3 s, 856.5 s, 812.3 m, 622.2 s, 599.3 m, 555.9 s

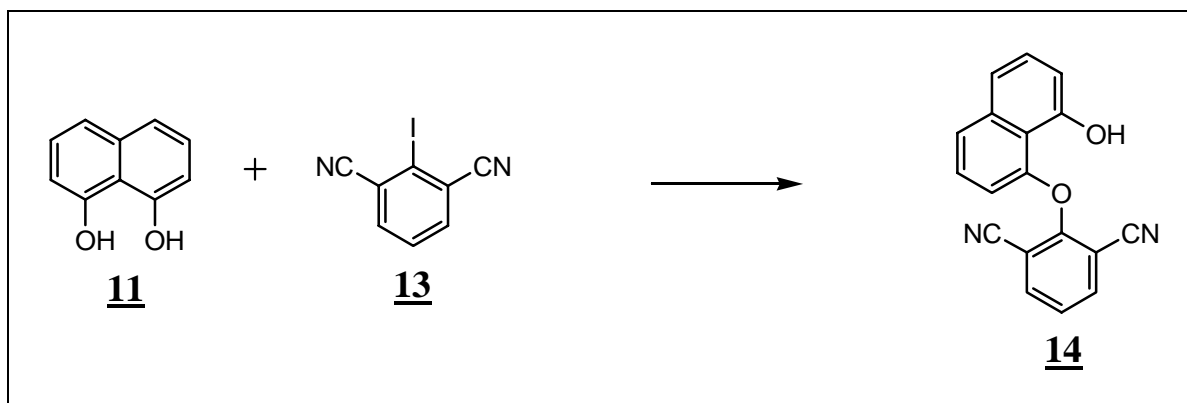
EA: C₈H₃IN₂ (253.93)

Ber.: C 37.82, H 1.19, N 11.03

Gef.: C 37.82, H 1.40, N 10.85

¹H-NMR: ([D₆] CDCl₃, 250 MHz): 7.59 (t, J = 7.1, 1H, 4-H), 7.78 (d, J = 7.2, 2H, 3-H, 5-H)

8.2.1.3 Synthese von 4-(8'-Hydroxy-naphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzol 14



In einem Zweihalskolben wurden 0.25 g NaH (6.2 mmol, einer 60%ige Dispersion in Mineralöl) in 3 ml abs. DMF suspendiert. Dazu gab man im Argongegenstrom langsam 1 g (6.2 mmol) Diol **11** gelöst in 8 ml abs DMF. Dabei gab es eine heftige Gasentwicklung und die Lösung färbte sich braun. Nach 30 min wurden zu der Reaktionslösung 1.6 g (6.2 mmol) Iodisophthalnitril **13**, gelöst in 8 ml abs. DMF, im Argongegenstrom zugetropft. Dann wurde die Lösung für 6 h bei 90 °C weitergerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und auf 30 ml 1M-HCl saures Eiswasser gegossen. Dabei fiel ein grauer, leicht flockiger Feststoff aus, der sich bei Zugabe von 20 ml EtOAc sofort auflöste. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und im HV getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 110 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:1) gereinigt. Der erhaltene Rückstand wurde in EtOAc/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 1.1 g (65 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:1), R_f = 0.28

Schmp.: 149-151 °C

IR (KBr): 3711.5 m, 3690 m, 3675.9 m, 3649.0 m, 3629.0 w, 3618.7 m, 3587.9 m, 3506.3 w, 3493.7 s, 3089.3 m, 3069.6 m, 2732.5 s, 2490.6 s, 2344.2 s, 2306.5 s, 2240.4 w, 2069.3 s, 1977.9 s, 1929.8 s, 1858.0 s, 1773.8 s, 1752.2 s, 1734.0 s, 1700.4 s, 1685.3 s, 1676.1 s, 1654.0

s, 1629.4 m, 1609.8 w, 1602.0 w, 1583.6 w, 1573.0 w, 1522.0 s, 1513.0 s, 1498.5 s, 1450.7 w, 1494.5 w, 1367.0 m, 1301.4 s, 1286.5 m, 1247.4 w, 1218.1 w, 1194.7 w, 1157.2 w, 1111.9 m, 1081.6 m, 1021.9 w, 968.7 s, 925.9 s, 887.0 s, 865.9 s, 854.0 w, 819.1 w, 800.9 w, 779.9 m, 767.5 s, 754.1 w, 669.5 s, 627.9 s, 612.0 s, 597.7 s, 570.1 s

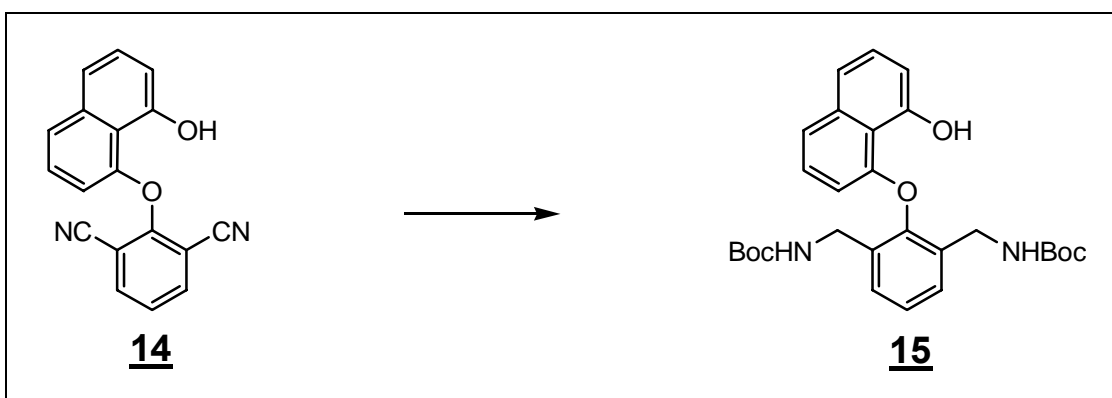
EA: C₁₈H₁₀N₂O₂ (286.07)

Ber.: C 75.52, H 3.52, N 9.79

Gef.: C 75.29, H 3.74, N 9.77

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz); 6.84 (d, J = 7.3, 1H, 2'-H), 7.10 (m, 1H, 8'-H), 7.33 (m, 4H, 5-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H), 7.77 (d, J = 8.1, 1H, 4'-H), 8.15 (d, J = 7.9, 2H, 4-H, 6-H), 9.95 (s, 1H, -OH)

8.2.1.4 Synthese von 8-[2,6-Bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]-naphth-1-ol 15



In einem einseitig verschlossenen Quarzzylinder wurden 0.28 g Pd/C, 0.09 g PtO₂ und 0.64 g Boc₂O (2.9 mmol) vorgelegt und dann 0.4 g (1.4 mmol) Naphthol **14**, gelöst in 20 ml abs. MeOH, zugegeben. Danach wurde der Quarzzylinder im Druckapparat platziert, dreimal mit Argon durchspült, mit H₂ ein Druck von 40 bar eingestellt, verschlossen und die Temperatur auf 55 °C eingestellt. Nach 42 h wurde die Druckapparat entlüftet, die Lösung

über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mit 20 g Kieselgel (EtOAc/Hex, 1:1) gereinigt. Der erhaltene Rückstand wurde in EtOAc/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 0.50 g (73 %)

Schmp.: 90 °C

DC: EtOAc/Hex, 1:1 R_f = 0.50

IR (KBr): 3868.2 s, 3851.8 m, 3836.0 s, 3819.8 s, 3805.7 s, 3799.9 s, 3768.0 s, 3749.1 s, 3742.2 s, 3733.6 s, 3721.1 s, 3709.6 s, 3699.8 s, 3687.6 s, 3674.0 s, 3667.9 s, 3654.6 s, 3647.3 s, 3627.4 s, 3585.9 s, 3460.4 m, 3365.1 m, 3055.0 m, 2978.7 m, 2932.1 m, 2364.0 s, 2343.7 s, 1921.9 s, 1682.7 w, 1646.0 s, 1633.8 s, 1608.7 m, 1580.2 m, 1528.0 w, 1456.2 m, 1391.8 m, 1366.0 m, 1298.4 m, 1277.3 m, 1250.8 w, 1222.5 m, 1166.8 m, 1087.9 s, 1047.6 m, 1028.0 m, 975.8 s, 938.8 s, 859.5 s, 819.3 m, 774.9 s, 757.4 m, 684.9 s, 668.2 s, 638.9 s

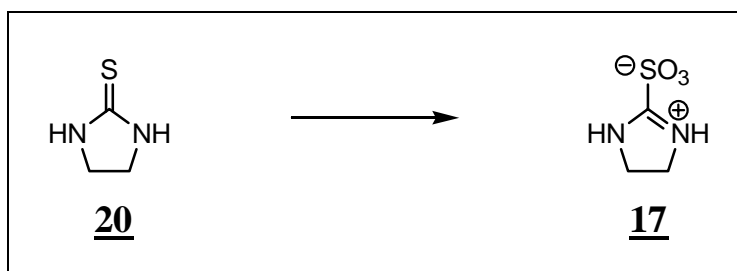
EA: $C_{28}H_{34}N_2O_6$ (494.24)

Ber.: C 68.00, H 6.93, N 5.66

Gef.: C 67.96, H 7.01, N 5.36

$^1\text{H-NMR}$: ($[D_6]$ DMSO; 250 MHz): 1.35 (s, 18H, t-Bu Carbamat); 3.84 (m, 4H, benzyl.-CH₂), 6.20 (d, J = 7.60, 1H, 8-H), 6.93 (m, 1H, 2-H), 7.18 (m, 8H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 3-H, 5-H, 6-H, benzyl. NH), 7.47 (d, J = 8.1, 1H, 6-H), 9.42 (s, 1H, -OH)

8.2.1.5 Synthese von 4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-sulfonsäure 17



Es wurden 5 g (49 mmol) Ethylenthioharnstoff **20** und 36 mg (0.075 mmol) Natriummolybdat-Dihydrat in 30 ml H₂O suspendiert, die Suspension im Eisbad auf 3 °C gekühlt und innerhalb von 4 h 34 ml (148 mmol) einer 15%igen H₂O₂-Lösung zugetropft, so daß die Temperatur 5 °C nicht überstieg. Mit der Zeit ging die blassblaue Suspension in eine farblose Lösung über, aus der gegen Ende der Zutropfzeit ein farbloser Feststoff auskristallisierte. Zur Vervollständigung der Kristallisation platzierte man den Kolben über Nacht im Kühlschrank, saugte die farblose Kristalle ab, wusch sie gründlich mit *i*-PrOH und trocknete im Vakuum.

Ausbeute : 3.25 g (44 %) Lit.: [42 %]⁷

Schmp.: 141-142 °C Lit.: [142 °C]⁷

IR (KBr): 3914.6 s, 3898.1 s, 3889.8 s, 3878.3 s, 3868.0 s, 3861.6 s, 3851.2 s, 3835.9 s, 3813.9 s, 3805.5 s, 3799.7 s, 3776.6 s, 3764.3 s, 3756.5 s, 3748.2 s, 3742.1 s, 3731.9 s, 3719.9 s, 3708.5 s, 3699.5 s, 3686.8 s, 3673.8 s, 3667.7 s, 3654.2 s, 3646.1 s, 3626.1 s, 3283.1 w, 3266.6 w, 3262.0 w, 3249.8 w, 3243.8 w, 3237.9 w, 3227.9 w, 3220.0 w, 3210.1 w, 3200.0 w, 3197.8 w, 3194.2 w, 3190.3 w, 3184.0 w, 3182.0 w, 3194.2 w, 3190.3 w, 3184.0 w, 3182.0 w, 3165.9 w, 3152.4 w, 3148.0 w, 2942.3 w, 2867.0 m, 2629.9 m, 2343.6 s, 2298.5 s, 2222.4 s, 2129.9 m, 2036.7 s, 1990.3 s, 1939.9 s, 1887.6 s, 1612.4 w, 1578.3 w, 1471.4 m, 1458.7 s, 1385.5 m, 1302.0 w, 1297.8 w, 1291.8 w, 1282.0 w, 1276.2 w, 1261.8 w, 1251.8 w, 1243.0 w, 1237.9 w, 1232.0 w, 1226.2 w, 1222.0 w, 1071.2 w, 1061.5 w, 1017.4 w, 976.5 m, 963.2 m, 910.0 s, 861.7 s, 834.3 s, 727.7 m, 658.1 w, 654.0 w, 648.0 w, 646.1 w, 637 w

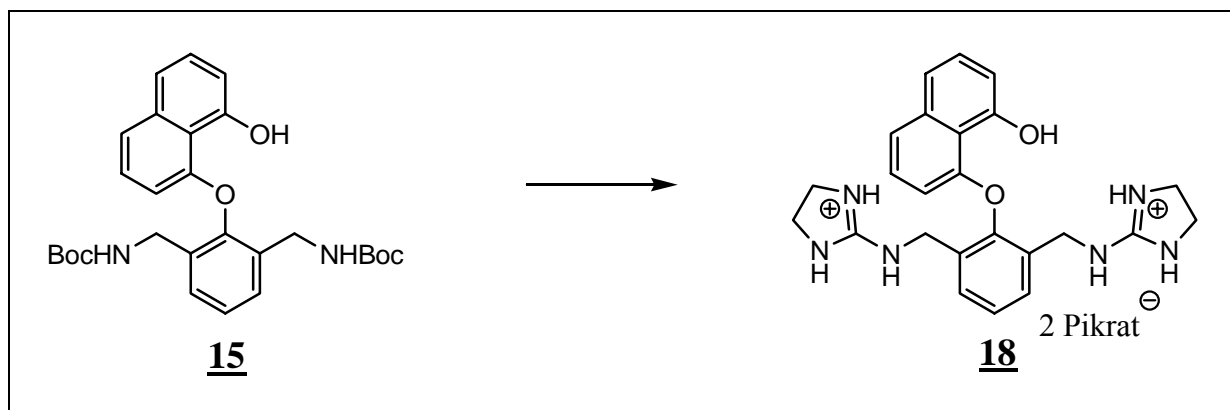
EA: C₃H₆N₂O₃S (150.01)

Ber.: C 24.00, H 4.03, N 18.66

Gef.: C 24.09, H 4.16, N 18.40

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz); 3.86 (s, 4H, Ethylen-CH₂), 10.39 (s, 2H, NH)

8.2.1.6 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure **18**



In einem Einhalskolben wurden 0.27 g (0.55 mmol) der zweifach geschützten Naphthol **15** in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, 2 ml TFA zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 6 ml NEt₃/H₂O/MeOH (1:1:1) gelöst, dann 0.18 g (1.20 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben und für weitere 12 h bei RT gerührt. Danach wurden zu der Lösung 10 ml H₂O sowie 2 ml 2 N NaOH zugegeben und in einem 100 ml Scheidetrichter zweimal mit 20 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 15 g Kieselgel (EtOAc/EtOH/H₂O/HOAc; 15:4:4:1) gereinigt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml MeOH und 0.44 g Pikrinsäure aufgelöst in 5 ml MeOH, zugegeben. Nach Zugabe von 5 ml H₂O fiel ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert, in HV getrocknet und in MeOH/H₂O umkristallisiert.

Ausbeute: 0.35 g (70 %)

Schmp.: 215-216 °C

DC: EtOAc/EtOH/H₂O/HOAc;(15:5:4:1), R_f = 0.16

IR (KBr): 3903.4 m, 3890.2 m, 3870.1 m, 3853.6 m, 3838.1 m, 3820.7 m, 3806.0 m, 3784.5 m, 3769.6 m, 3758.3 m, 3750.4 m, 3744.1 m, 3734.6 m, 3723.7 m, 2711.4 m, 2700.7 m,

3689.3 m, 3675.7 m, 3655.9 m, 3648.7 m, 3628.4 m, 2618.0 m, 3608.0 m, 3587.3 m, 3567.4 w, 3366.0 w, 3330.6 w, 3242.6 w, 3081.1 w, 2927.9 m, 2372.6 s, 2344.4 s, 2278.1 s, 1910.0 s, 1870.1 s, 1844.8 s, 1751.3 s, 1740.3 s, 1734.2 s, 1718.0 s, 1698.0 s, 1675.6 w, 1654.2 m, 1635.9 w, 1600.3 w, 1578.3 w, 1560.4 w, 1534.0 m, 1522.1 m, 1508.0 m, 1498.6 m, 1490.3 m, 1474.8 m, 1465.6 m, 1458.0 m, 1449.9 m, 1431.3 m, 1394.3 s, 1384.1 m, 1364.2 w, 1334.1 w, 1313.7 w, 1295.8 w, 1270.1 w, 1187.7 m, 1162.2 m, 1133.9 s, 1078.4 m, 1025.1 m, 942.2 s, 929.8 s, 910.0 s, 847.7 s, 817.8 s, 805.8 s, 788.3 m, 778.3 m, 745.8 m, 711.2 m, 681.8 s, 669.9 s, 661.6 s, 638.1 s, 619.7 s, 607.8 s, 584.1 s, 575.5 s, 558.5 s

EA: $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ (888.21) \times 1.0 H_2O (906.22)

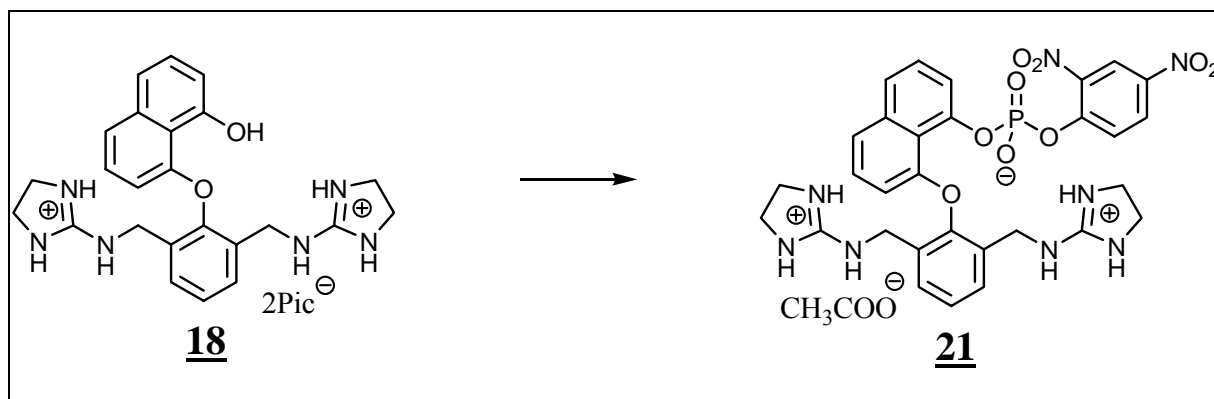
Ber.: C 47.68, H 3.75, N 18.53

Gef.: C 47.71, H 4.02, N 18.24

^1H -NMR: ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250 MHz); 3.4 (s, 8H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol), 4.21 (m, 4H, benzyl.- CH_2), 6.17 (d, $J = 6.9$, 1H, 8-H), 6.95 (m, 1H, 2-H); 7.19 (t, $J = 8.0$, 1H, 7-H); 7.48 (m, 5H, 3-H, 4-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.52 (d, $J = 7.7$, 1H, 6-H), etwa 7.4-8.4 (br. s, 2H, 2H, NH Imidazol austauschbar mit D_2O), 8.43 (t, 2H, $J = 5.6$, benzyl.-NH, austauschbar mit D_2O); 8.91 (s, 4H, Pikrat-H), 9.35 (s, 1H, -OH, austauschbar mit D_2O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H -COSY Spektrums: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz)

8.2.2 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Phosphorsäuremono-(2,4-dinitrophenyl)ester, Salz mit Monoacetat **21**



In einem Zweihalskolben wurden 0.18 g (0.20 mmol) Bis(guanidinium)naphthol **18** und 0.11 g (0.20 mmol) 2,4-BDNPP **5** im Argongegenstrom in 5 ml abs. DMF gelöst und 0.15 ml N-Ethyl-diisopropylamin zugegeben. Nach 3 h wurde die Lösung mit 30 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt, 4 ml 2 N NaOH zugegeben und zweimal mit 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. Danach wurde der gelbe Feststoff in MeOH gelöst und über eine Ionentauschersäule (Dowex 1×8, Chloridform) in seine Chloridform überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit 30 g Kieselgel (EtOAc/H₂O/EtOH/HOAc; 14:4:4:1) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (41 %)

DC: EtOAc/H₂O/EtOH/HOAc; (14:4:4:1) R_f = 0.24

Schmp.: 114-115 °C

IR (KBr): 3854 m, 3839 m, 3807 m, 3712 m, 3690 m, 3676 m, 3630 m, 3385 m, 2924 m, 2853 m, 2346 s, 2279 s, 1734 s, 1675 m, 1635 m, 1605 m, 1564 m, 1541m, 1482 m, 1458 m,

1432 s, 1364 m, 1344 m, 1315 m, 1265 m, 1195 m, 1162 s, 1118 s, 1091 m, 1038 s, 928 s, 909 s, 874 s, 833 s, 822 s, 789 s, 734 s, 710 s, 663 s

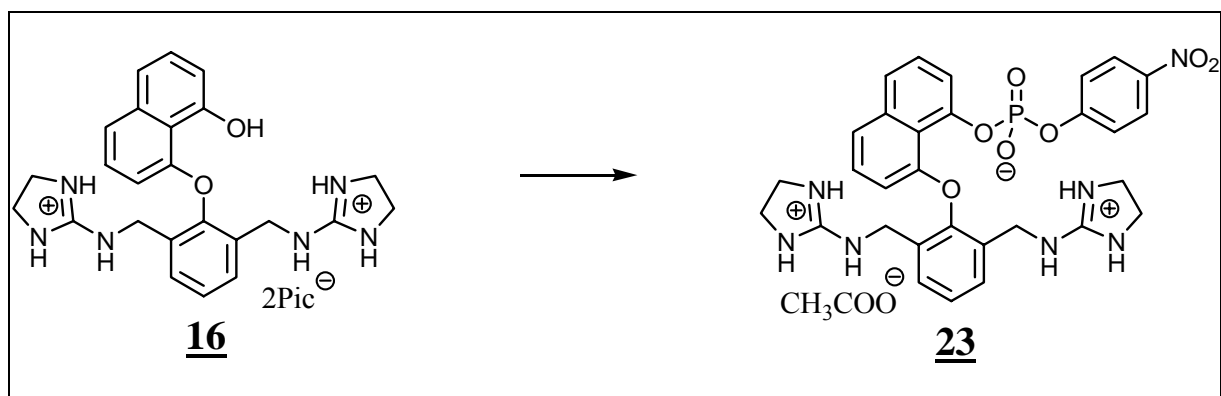
^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250 MHz): 3.37 (m, 8H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol), 4.07 (m, 4H, benzyl- CH_2), 5.0-6.8 (br. s, austauschbar mit D_2O , 2H, N-H Imidazol) 6.22 (d, $J = 6.1$, 1H, 8-H), 7.24 (m, 1H, 2-H), 7.31 (t, 1H, $J = 6.5$, 7-H), 7.37 (t, 1H, $J = 6.9$, 4'-H), 7.48 (m, 3H, 3-H, 3'-H, 5'-H), 7.61 (d, 1H, $J = 7.9$, 6-H), 7.76 (d, 1H, $J = 8.4$, 4-H), 7.98 (d, 1H, $J = 9.3$, Dinitrophenyl-5-H), 8.48 (d, 1H, $J = 9.3$, Dinitrophenyl-5-H), 8.71 (t, 2H, $J = 5.3$, benzyl.-NH, austauschbar mit D_2O), 8.79 (s, 1H, Dinitrophenyl-3-H)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H COSY ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

MS (ESI^+): 677.3 (677.19 berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_9\text{P}^+$)

^{31}P NMR: ($[\text{D}]\text{DMSO}$, 400 MHz); -11.40

8.2.3 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Phosphorsäuremono-(4-nitrophenyl)ester, Salz mit Monoacetat **23**



In einem Zweihalskolben wurden 0.10 g (0.11 mmol) Bis(guanidinium)naphthol **18** und 0.05 g (0.11 mmol) 4-BNPP **9** im Argongegenstrom in 5 ml abs. DMF gelöst und 0.15 ml N-Ethyl-diisopropylamin zugegeben. Nach 2 Wochen wurde die Lösung mit 20 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt, 2 ml 2 N NaOH zugegeben und zweimal mit 15 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. Danach wurde der gelbe Feststoff in MeOH gelöst und über eine Ionentauschersäule (Dowex 1×8, Chloridform) in seine Chloridform überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit 15 g Kieselgel (EtOAc/H₂O/EtOH/HOAc; 14:4:4:1) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (41 %)

DC: EtOAc/H₂O/EtOH/HOAc; (14:4:4:1) R_f = 0.2

Schmp.: 112 °C

IR (KBr): 3841 m, 3811 m, 3802 m, 3706 m, 3685 m, 3632 m, 3380 m, 2922 m, 2860 m, 2340 s, 2281 s, 1730 s, 1673 m, 1632 m, 1601 m, 1544 m, 1478 m, 1452 m, 1431 s, 1359 m, 1311 m, 1260 m, 1198 m, 1158 s, 1114 s, 1093 m, 1033 s, 926 s, 905 s, 872 s, 838 s, 826 s, 790 s, 730 s, 708 s

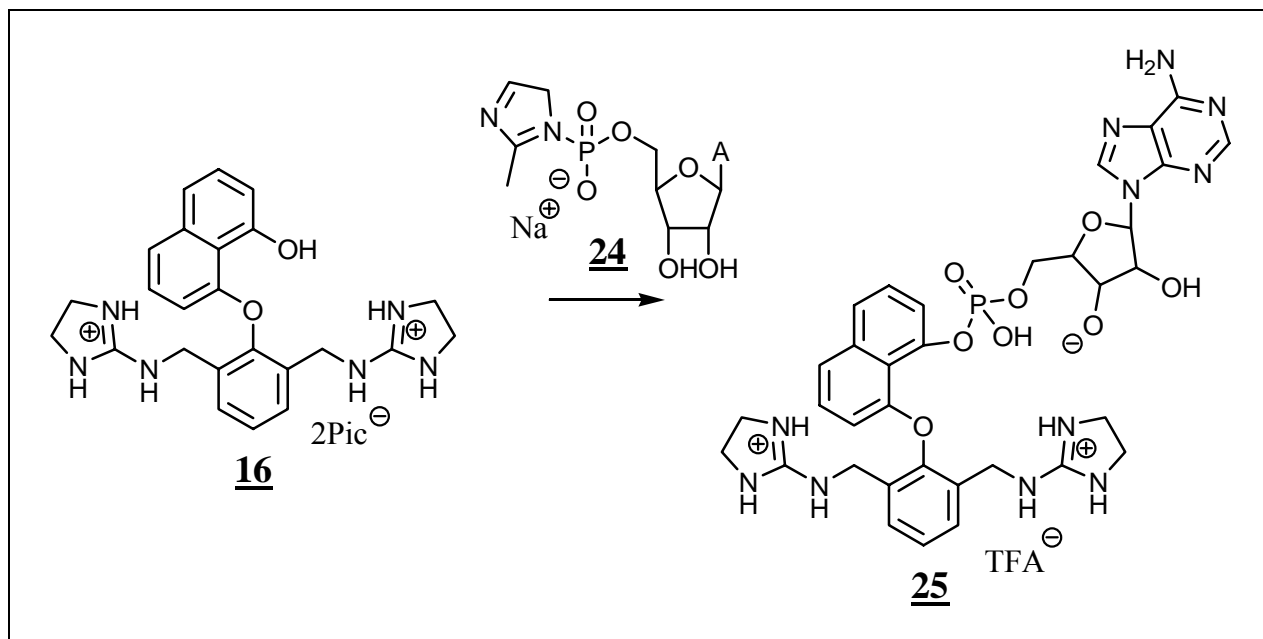
¹H-NMR ([D₆]DMSO; 400 MHz): 3.32 (m, 8H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol), 4.18 (m, 4H, benzyl-CH₂), 6.29 (d, J = 7.5, 1H, 8-H), 7.17 (m, 1H, 2-H), 7.27 (t, 1H, J = 8.0, 7-H), 7.37 (t, 1H, J = 8.03, 4'-H), 7.47 (m, 5H, 3-H, 3'-H, 5'-H, Nitrophenyl-2-H, Nitrophenyl-6-H), 7.60 (d, 1H, J = 8.0, 6-H), 7.73 (d, 1H, J = 8.3, 4-H), 7.98 (d, 2H, J = 8.5, Nitrophenyl-3-H, Nitrophenyl-5-H), 8.3-9.2 (br. s, 2H, N-H Imidazol), 8.78 (t, 1H, J = 7.5, benzyl.-NH)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

MS (ESI⁺): 631.4 (631.19 berechnet für C₃₀H₃₀N₇O₇P⁺)

³¹P NMR: ([D]DMSO, 400 MHz); -11.12

8.2.4 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Ester mit Adenosyl-5'-mono-phosphorsäure, Salz mit Trifluoressigsäure 25



In einem Einhalskolben wurden 0.02 g (0.022 mmol) Bis(guanidinium)naphthol **18** und 15 mg Adenosinphosphoimidazolid **24** in 2 ml abs. DMF und 70 μ l N-Ethyldiisopropylamin gelöst und für 7 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel einer Kugelrohrdestillation unterworfen, der erhaltene Rückstand im MeOH gelöst und über eine Ionentauschersäule (Dowex 1 \times 8, Chloridform) in seine Chloridform überführt. Anschließend wurde die Probe durch präoperativer reversed phase HPLC gereinigt.

HPLC: Analytisch: Maisch Reprosil-Pur RP C18-AQ (10 μ , 250 \times 20 mm), Gradient:

H₂O/MeCN 80:20 + 1 % TFA, Detektion: 275 nm,

Semipräp.: Merck Lichrosorb Select B, H₂O/MeCN 80:20 + 1 % TFA

Retentionszeit: 4.59 min.

Ausbeute: 0.01g (53 %)

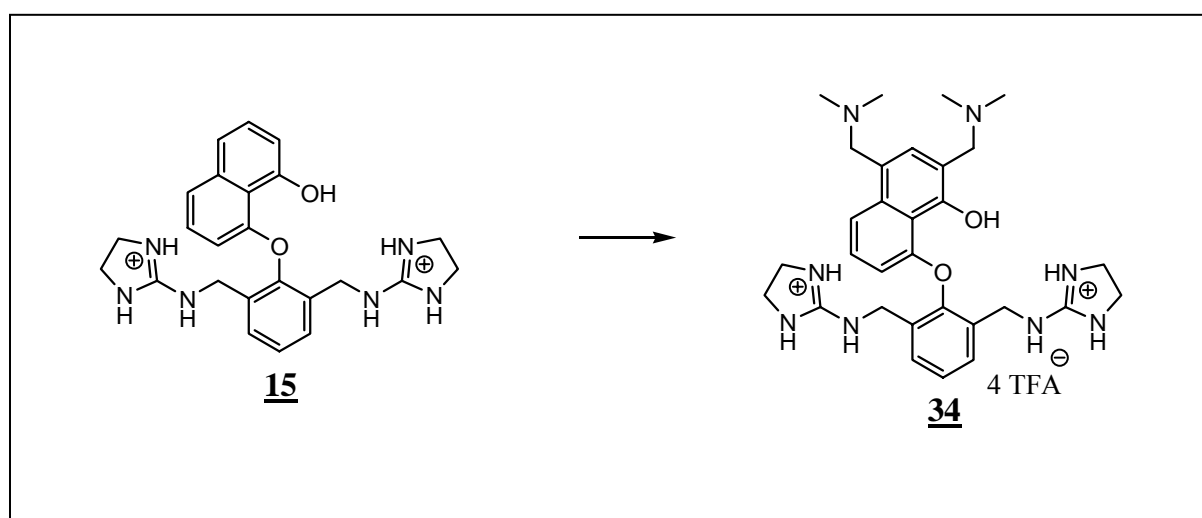
Schmp.: 178-180 °C

IR (KBr): 3425 m, 3381m, 3382w, 3280 m, 2932 m, 2908w, 2861 w, 1676 s, 1656w, 1607 w, 1541 w, 1452 m, 1371 m, 1206 m, 1162 w, 1143 w, 1135 s, 1131 w, 1076 w, 1021 m, 812 w

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$; 250 MHz): 3.17 (m, 11H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol, Adenosin-5-H, Adenosin-4-H), 4.02 (m, 6H, benzyl.- CH_2 , Adenosin-3-H, Adenosin-3-OH), 4.61 (t, 1H, $J = 5.6$, Adenosin-2-H), 5.12- 5.8 (br. s, 2H, N-H Imidazol), 5.88 (m, 1H, Adenosin-2-OH), 5.97 (d, 1H, $J = 6.1$, Adenosin-1-H), 6.28 (d, $J = 6.4$, 1H, 8-H), 7.24 (m, 3H, 2-H, Adenosin- NH_2), 7.31 (t, 1H, $J = 6.6$, 7-H), 7.37 (t, 1H, $J = 6.8$, 4'-H), 7.48 (m, 3H, 3-H, 3'-H, 5'-H), 7.61 (d, 1H, $J = 7.9$, 6-H), 7.76 (m, 2H, 4-H, Adenosin-H), 8.15 (s, 1H, Adenosin-H), 8.71 (t, 2H, $J = 5.4$, benzyl.-NH, austauschbar mit D_2O),

MS (ESI^+): 760.3 (760.27 berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_8\text{P}^+$)

8.2.5 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 34



In einem Dreihalskolben wurden 100 mg (0.23 mmol) Bis(guanidinium)-naphthol **15** unter Argonatmosphäre in 12 ml abs. CH₃CN gelöst. Dann wurde die Reaktionslösung auf 60°C erwärmt und 0.13 g (1.38 mmol) N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, suspendiert in 4 ml abs. CH₃CN, tropfenweise zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand mittels präoperativer reversed phased HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der fast farblose Feststoff wurde im HV getrocknet.

HPLC: Analytisch: Maisch Reprosil-Pur RP C18-AQ (10µ, 250 × 20 mm), Gradient:

H₂O/MeCN 94:6+1 % TFA, Detektion: 275 nm,

Semipräp.: Merck Lichrosorb Select B, H₂O/MeCN 94:6+1 % TFA

Retentionszeit: 4 ½ min

Ausbeute: 0.03g (13 %)

IR (KBr): 3427 m, 3280 m, 2931 m, 2860 w, 1670 s, 1609 w, 1542 w, 1462 m, 1373 m, 1207 m, 1168 w, 1148 w, 1138 s, 1132 w, 1071 w, 1031 m, 822 w

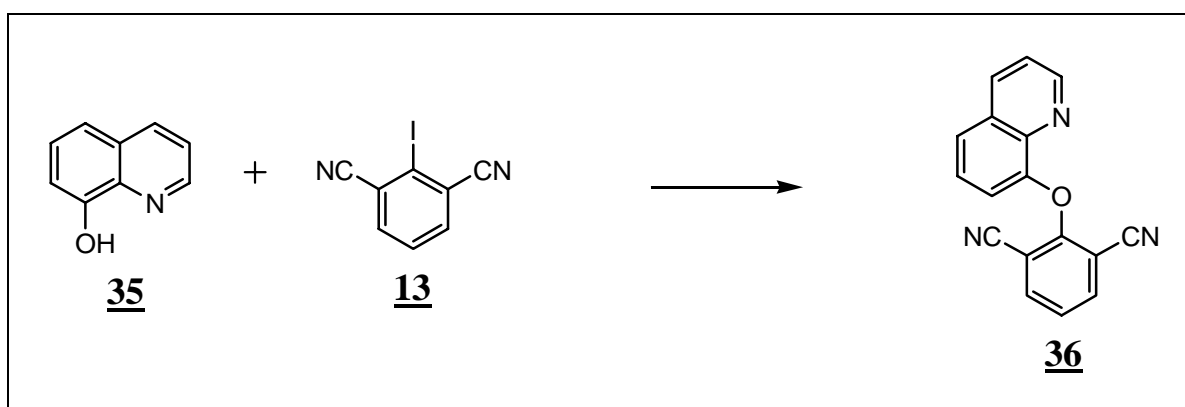
¹H-NMR ([D₆]DMSO; 250MHz): 2.50 (s, 12H, 2×N-(CH₃)₂), 3.33 (m, 8H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol), 4.06 (s, 2H, N-CH₂), 4.11 (s, 2H, N-CH₂), 4.13 (m, 4H, benzyl.-CH₂), 6.16 (d, J = 7.6, 1H, 8-H), 7.12 (t, J = 8.1, 7-H), 7.35 (m, 4H, 3-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.48 (d, J = 8.6, 6-H), 7.5-8.1 (br. s, 2H, NH Imidazol, austauschbar mit D₂O), 7.88 (t, 2H, J = 5.6, benzyl.-NH, austauschbar mit D₂O), 10.17 (s, 1H, -OH, austauschbar mit D₂O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H-COSY Spektrums: ([D₆] DMSO, 400 MHz)

MS (ESI⁺): 545.5 (545.3 berechnet für C₃₀H₄₁N₈O₂⁺)

8.2.6. Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-*N*-hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin, Salz mit Pikrinsäure 39

8.2.6.1 Synthese von 4-(Chinolin-1'-yloxy)-3,5-Dicyanobenzol 36



In einem Zweihalskolben wurden 0.18 g NaH (4.4 mmol, einer 60%ige Dispersion in Mineralöl) in 4 ml abs. DMF suspendiert. Dazu gab man im Argongegenstrom langsam 1.07 g (7.3 mmol) 8-Hydroxy-chinolin **35** gelöst in 5 ml abs DMF. Dabei gab es eine heftige Gasentwicklung und die Lösung färbte sich grün. Nach 30 min wurden zu der Reaktionslösung 1.86 g (6.2 mmol) Iodisophthalnitril **13**, gelöst in 10 ml abs. DMF, im Argongegenstrom zugetropft. Dabei färbte sich die Lösung dunkelbraun. Dann wurde die Lösung für 6 h bei 90 °C weitergerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und auf 30 ml 1M-HCl saures Eiswasser gegossen. Dabei fiel ein farbloser, leicht flockiger Feststoff aus, der sich bei Zugabe von 20 ml EtOAc sofort auflöste. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und im HV getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 120 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:2) gereinigt. Der erhalten Rückstand wurde in EtOAc/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 1.09 g (55 %)

Schmp.: 149-150 °C

IR (KBr): 3852.1 w, 3836.1 m, 3733.7 m, 3647.9 m, 3627.8 m, 3070.4 m, 3021.8 m, 2729.9 m, 2364.2 m, 2343.8 s, 2243.1 w, 2232.2 w, 1988.5 s, 1960.7 s, 1923.2 s, 1883.4 s, 1801.7 s, 1737.9 s, 1684.2 s, 1662.0 s, 1645.9 s, 1624.7 s, 1592.2 w, 1581.5 m, 1567.8 m, 1521.3 s, 1498.1 w, 1470.0 m, 1461.7 m, 1445.3 w, 1387.9 w, 1368.3 m, 1318.5 w, 1290.7 w, 1261.9 w, 1238.6 w, 1207.8 m, 1191.6 m, 1176.0 s, 1160.1 s, 1135.9 s, 1085.9 w, 1075.7 m, 1057.3 m, 1028.1 s, 1000.1 s, 982.3 s, 965.9 s, 827.2 w, 808.4 s, 791.7 w, 756.1 w, 739.6 w, 791.7 w, 756.1 w, 739.6 w, 708.1 s, 674.3 s, 636.1 s, 625.2 s, 596.2 s, 582.0 s, 555.1 s

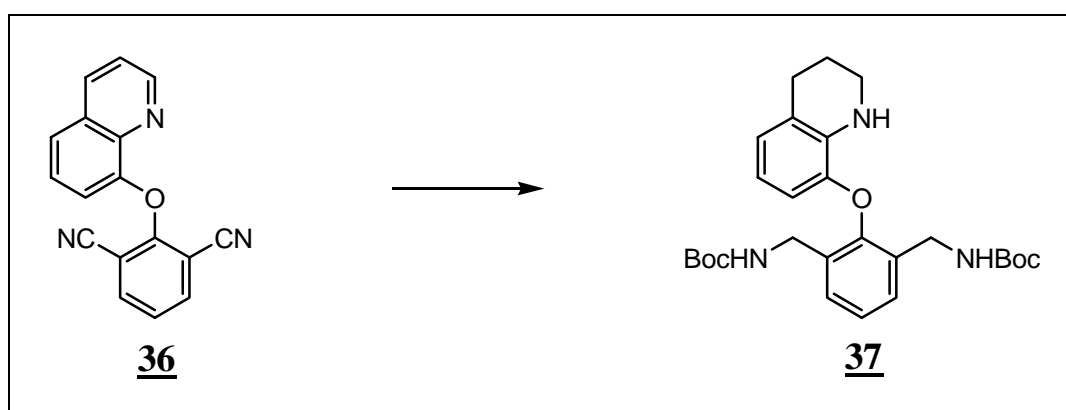
EA: C₁₇H₉N₃O (271.07)

Ber.: C 75.27, H 3.34, N 15.49

Gef.: C 75.20, H 3.52, N 15.62

¹H-NMR: (DMSO, 250 MHz), 7.48 (m, 4H, 5-H, 3'-H, 6'-H, 7'-H), 7.93 (d, J= 6.6, 1H, 2'-H), 8.20 (d, J= 7.9, 2H, 4-H, 6H), 8.48 (d, J= 8.4, 1H, 8'-H), 8.82 (d, J= 4.2, 1H, 4'-H)

8.2.6.2 Synthese von 8-[2,6-Bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]-2,3,4-dihydro-chinolin 37



In einem einseitig verschlossenen Quarzzyylinder wurden 0.14 g Pd/C, 0.04 g PtO₂ und 0.34 g Boc₂O (1.55 mmol) vorgelegt und dann 0.2 g (0.74 mmol) Naphthol **36**, gelöst in 15 ml abs.

MeOH, zugegeben. Danach wurde der Quarzzylinder im Druckapparat platziert, dreimal mit Argon durchspült, mit H₂ ein Druck von 40 bar eingestellt, verschlossen und die Temperatur auf 55 °C eingestellt. Nach 42 h wurde die Druckapparat entlüftet, die Lösung über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mit 20 g Kieselgel (EtOAc/Hex, 1:2) gereinigt. Der erhaltene Rückstand wurde in EtOAc/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 0.20 mg (56 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:2), R_f = 0.45

Schmp.: 166-167 °C

IR (KBr): 3711.9 s, 3701.9 s, 3690.0 s, 3676.0 s, 3650.1 s, 3629.9 s, 3588.2 s, 3567.6 s, 3339.4 m, 3042.9 s, 3003.6 s, 2976.5 m, 2931.3 m, 2865.5 s, 2843.1 s, 2368.4 s, 2344.0 s, 2235.0 s, 1869.9 s, 1844.9 s, 1830.9 s, 1792.7 s, 1773.7 s, 1682.8 w, 1647.5 s, 1615.3 s, 1582.0 m, 1527.7 w, 1506.6 w, 1457.6 m, 1437.3 m, 1390.5 m, 1365.9 m, 1329.2 m, 1296.8 m, 1275.0 m, 1251.1 w, 1232.7 m, 1170.5 w, 1101.6 s, 1090.8 s, 1049.0 m, 1029.2 s, 986.8 s, 971.7 s, 939.8 s, 915.6 s, 893.0 s, 862.6 s, 828.8 s, 777.9 s, 760.8 s, 729.5 s, 695.7 s, 668.4 s, 658.0 s, 602.3 s, 582.0 s, 561.5 s

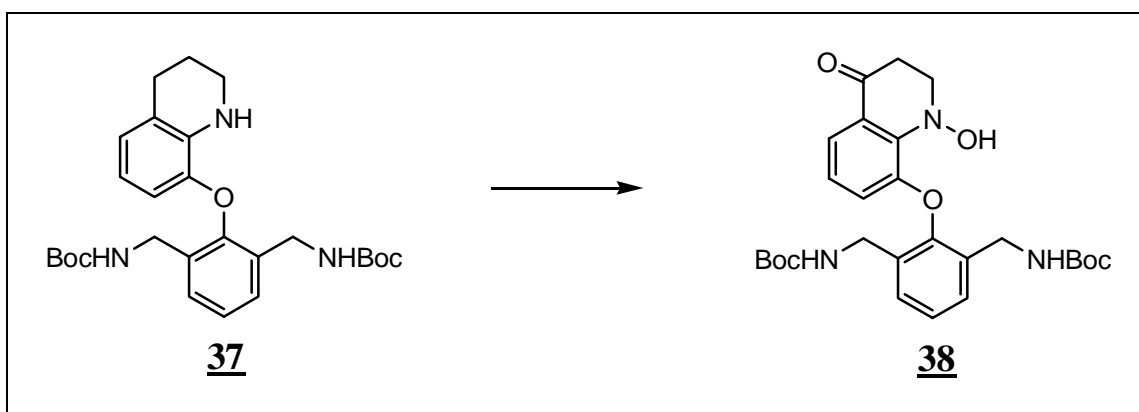
EA: C₂₇H₃₇N₃O₅ (483.27)

Ber.: C 67.06, H 7.71, N 8.69

Gef.: C 67.23, H 7.40, N 9.01

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz), 1.38 (s, 18H, t-Bu Carbamat); 1.87 (q, J = 6.1, 2H, 2-H), 2.71 (t, J = 6.2, 2H, 3-H), 3.33 (m, 2H, 4-H), 3.88 (m, 4H, benzyl.-CH₂), 5.50 (breit s, 1H, Anilin-NH), 5.87 (d, J = 6.9, 1H, 8-H), 6.22 (t, J = 7.7, 1H, 7-H), 6.55 (d, J = 6.9, 1H, 6-H), 7.16 (m, 5H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, benzyl.-NH)

8.2.6.3 Synthese von 8-[2,6-Bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-phenoxy]-*N*-hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin 38



In einem Zweihalskolben wurden 238 mg (0.5 mmol) Edukt **37** in 2 ml abs. CH₃CN gelöst und mit 250 mg 4Å-Molekularsieb versetzt. Dann wurden 88 mg (0.75 mmol) NMO gelöst in 2 ml abs. CH₃CN und 9 mg (0.025 mmol; 5 %) TPAP ebenfalls gelöst in 2 ml abs. CH₃CN, in Argongegenstrom zugegeben. Dann rührte man die Probe für 3 h bei RT, wobei sich die Lösung mit der Zeit dunkelgrün färbte. Anschließend wurde die Probe über eine Mischung aus Kieselgel/Celite filtriert und mit viel EtOAc nach gewaschen. Daraufhin wurde das Lösungsmittel in Vakuum entfernt und der Rückstand mit 23 g Kieselgel mit (EtOAc/Hex; 1:2 + 0.5 % NEt₃) gereinigt. Als die Lösung einrotiert wurde, blieb ein farbloser Feststoff zurück. Der erhaltene Rückstand wurde zuletzt in EtOAc umkristallisiert.

Ausbeute: 152 mg (60 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:2:+ 0.5 % NEt₃), R_f= 0.38

Schmp.: 192 °C

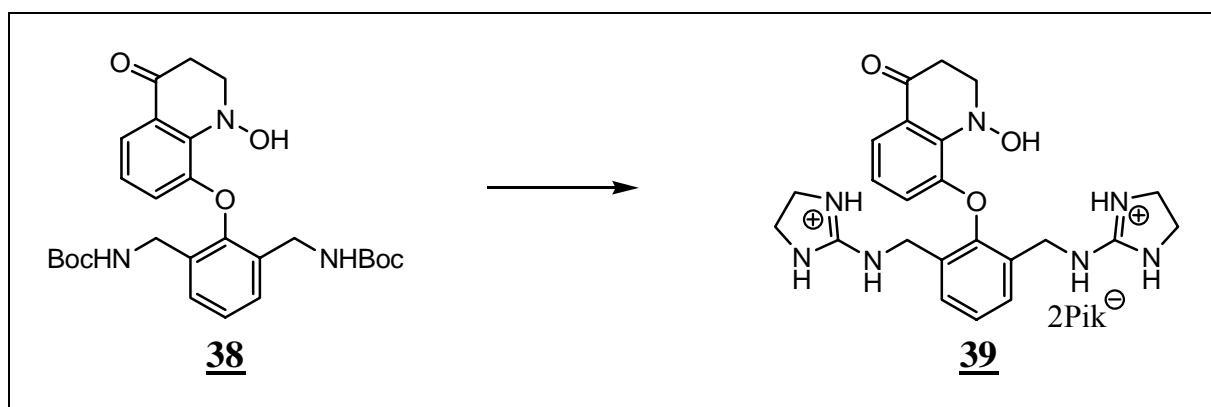
IR (KBr): 3852.4 m, 3838.1 m, 3805.9 m, 3750.0 m, 3734.0 m, 3710.5 m, 3688.9 m, 3674.4 m, 3648.1 m, 3628.0 m, 3365.2 m, 3072.6 m, 2976.3 m, 2931.0 m, 2344.1 s, 2282.5 s, 1692.2 w, 1669.9 w, 1621.0 s, 1588.1 s, 1496.4 m, 1455.6 m, 1439.5 m, 1384.9 m, 1365.9 m, 1332.1

s, 1267.6 m, 1247.9 w, 1169.3 w, 1087.3 s, 1048.5 s, 1021.2 s, 984.4 s, 952.9 s, 891.4 s, 681.7 s, 822.2 s, 776.9 s, 764.4 s, 732.5 s, 714.2 s, 670.1 s, 624.0 s

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz): 1.37 (s, 18H, t-Bu Carbat), 2.53 (t, $J = 7.9$, 2H, 2-H), 2.92 (t, $J = 7.9$, 2H, 3-H), 3.90 (m, 4H, benzyl.-CH₂), 6.07 (d, $J = 7.8$, 1H, 8-H), 6.73 (t, $J = 7.5$, 1H, 7-H), 6.84 (d, $J = 7.2$, 1H, 6-H), 7.25 (m, 5H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, benzyl.NH), 9.77 (s, 1H, 1-N-OH).

MS (MALDI): 513.12 (513.25 berechnet für C₂₇H₃₅N₃O₇)

8.2.6.4 Synthese von 8-{2',6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-N-hydroxy-2,3-dihydro-4-oxochinolin, Salz mit Pikrinsäure **39**



In einem Einhalskolben wurden 60 mg (0.12 mmol) der zweifach geschützten Naphthol **38** in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst, 1 ml TFA zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dann in 6 ml NEt₃/H₂O/MeOH (1:1:1) gelöst und 53 mg (0.35 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben und für weitere 16 h gerührt. Dann wurde zu der Lösung 5 ml H₂O sowie 1 ml 2 N NaOH zugegeben und in einem 100 ml Scheidetrichter zweimal mit 15 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der

Rückstand der Rückstand mit 10 g Kieselgel (EtOAc/EtOH/H₂O/HOAc; 15:4:4:1) gereinigt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml MeOH gelöst in 10 ml MeOH gelöst und 100 mg Pikrinsäure aufgelöst in 4 ml MeOH, zugegeben. Nach Zugabe von 3 ml H₂O fiel ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert, in HV getrocknet und in MeOH/H₂O umkristallisiert.

Ausbeute: 69 mg (63 %)

Schmp.: 210-212 °C

DC: EtOAc/EtOH/H₂O/HOAc;(15:5:4:1), R_f = 0.26

IR (KBr): 3900.4 s, 3878.0 s, 3849.0 w, 3830.6 m, 3824.7 m, 3755.3 w, 3753.2 s, 3744.6 m, 3730.6 s, 3725.8 m, 2707.2 w, 2702.7 m, 3690.6 m, 3671.2 m, 3650.9 m, 3644.4 m, 3620.6 w, 2616.2 s, 2277.3 s, 1911.0 w, 1877.6 s, 1840.7 m, 1758.2 s, 1737.2 s, 1730.4 s, 1712.9 s, 1696.2 m, 1672.8 m, 1650.6 m, 1632.7 m, 1608.2 m, 1574.3 m, 1562.8 w, 1532.6 w, 1526.4 w, 1502.8 s, 1499.4 s, 1493.6 m, 1469.8 m, 1464.5 m, 1454.5 s, 1450.9 s, 1429.3 s, 1392.6 m, 1382.6 m, 1360.6 m, 1333.1 m, 1312.8 m, 1292.6 m, 1273.6 m, 1177.6 m, 1160.9 m, 1131.9 m, 1079.1 m, 1020.1 w, 936.2 w, 929.3 m, 909.3 m, 844.7 m, 812.2 s, 800.8 s, 787.4 s, 772.3 s, 652.6 s, 633.6 s, 616.7 s, 606.6 m, 582.1 m, 572.5 m, 555.5 m

EA: C₃₅H₃₃N₁₃O₇ (907.21) × 2.0 H₂O (943.23)

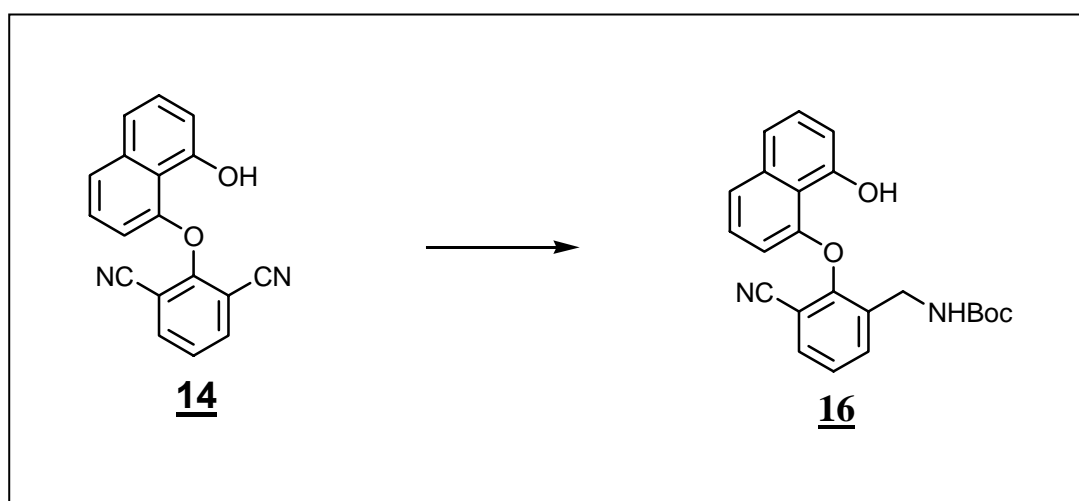
Ber.: C 44.54, H 3.95, N 19.29

Gef.: C 44.74, H 4.02, N 19.06

¹H-NMR: ([D₆]DMSO, 250 MHz): 2.56 (t, J = 7.6, 2H, 2-H), 2.92 (t, J = 8.0, 2H, 3-H), 3.48 (s, 8H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol), 4.21 (m, 4H, benzyl.-CH₂), 6.07 (d, J = 7.7, 1H, 8-H), 6.77 (t, J = 7.4, 1H, 7-H), 6.90 (d, J = 7.4, 1H, 6-H), 7.43 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), etwa 7.5-8.4 (br. s, 2H, NH Imidazol austauschbar mit D₂O, 2H), 8.44 (t, 2H, J = 5.4, benzyl.-NH, austauschbar mit D₂O), 8.59 (s, 4H, Pikrat-H), 9.29 (s, 1H, 1-N-OH)

8.2.7 Synthese von 3-[(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-2-(8'-hydroxy-naphth-1'-yloxy)-benzonitril, Salz mit Pikrinsäure **40**

8.2.7.1 3-(*tert*-Butoxycarbonylaminomethyl)-2-(8'-hydroxynaphth-1'-yloxy)-benzonitril **16**



In einem einseitig verschlossenen Quarzzylinder wurden 35 mg Pd/C, 100 mg PtO₂ und 2.40 g BocO₂ (11.01 mmol) vorgelegt. Dazu wurden 1.05 g (3.67 mmol) des Naphthols **14** gelöst in 20 ml abs. MeOH, zugegeben. Der Quarzzylinder wurde in einer Druckapparatur platziert. Das Reaktionsgemisch wurde bei einem H₂-Druck von 47 bar und einer Temperatur von 55 °C 11 h gerührt. Die so erhaltene Lösung wurde über Celite abfiltriert und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch an 80 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.76 g (53 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:2), R_f = 0.37

Schmp.: 65-66 °C

IR (KBr): 3854 m, 3839 m, 3821 m, 3802 m, 3750 m, 3734 m, 3711 m, 3689 m, 3676 m, 3649 m, 3629 m, 3357 m, 2977 m, 2933 m, 2345 s, 2285 s, 1700 w, 1596 m, 1576 m, 1521 m, 1450 m, 1391 m, 1365 m, 1249 w, 1166 w, 1087 s, 1047 m, 1028 m, 1005 s, 940 s, 864 s, 817 s, 778 s

EA: C₂₃H₂₂N₂O₄ (390.16) × 0.5 EtOAc (434.49)

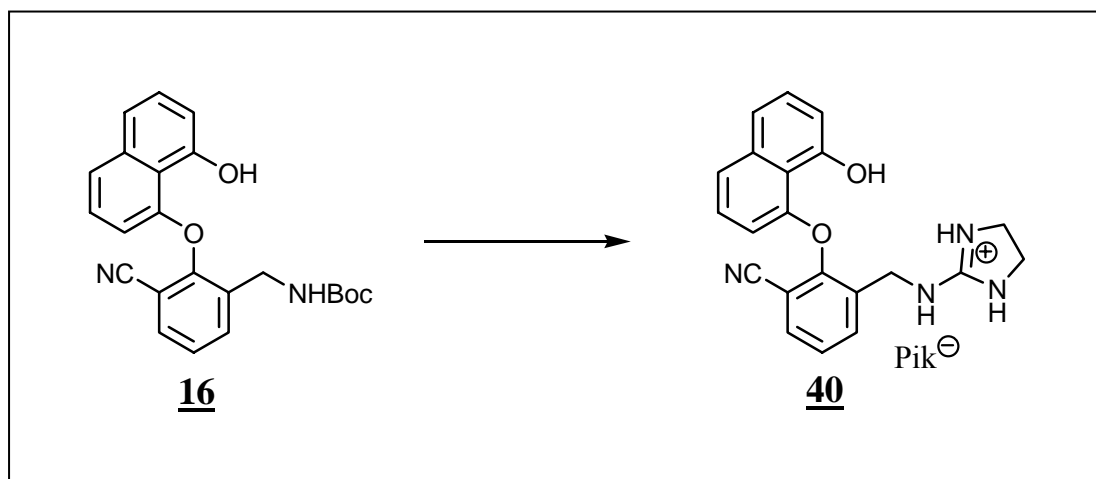
Ber.: C 69.11 H 6.03 N 6.45

Gef.: C 68.91 H 6.34 N 6.71

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz) ; 1.21 (s, 9H, t-Bu Carbamat), 3.80 (m, 2H, benzyl-CH₂), 6.18 (d, 1H, J = 7.5, 2'-H), 6.79 (m, 1H, J = 4.3, 8'-H), 7.09 (t, 1H, J = 7.9, 3'-H), 7.25 (m, 2H, 6'-H, 7'-H), 7.36 (m, 2H, 5-H, 4'-H), 7.71 (d, 1H, J = 9.1, 4-H), 7.80 (d, 1H, J = 6.3, 6-H), 9.54 (s, 1H, -OH)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H-COSY Spektrums: ([D₆] DMSO, 400 MHz)

8.2.7.2 Synthese von 3-[(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-2-(8'-hydroxy-naphth-1'-yloxy)-benzonitril, Salz mit Pikrinsäure 40



In einem Einhalskolben wurden 0.15 g (0.37 mmol) der einfach reduzierten Benzonitrilverbindung **16** in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst, 1 ml TFA zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dann in 6 ml $\text{NEt}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1:1) gelöst und 86 mg (0.58 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben und für weitere 12 h gerührt. Dann wurde zu der Lösung 10 ml H_2O sowie 2 ml 2 N NaOH zugegeben und in einem 100 ml Scheidetrichter zweimal mit 20 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 10 g Kieselgel ($\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HOAc}$; 15:4:4:1) gereinigt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml MeOH gelöst und 60 mg Pikrinsäure aufgelöst in 5 ml MeOH, zugegeben. Nach Zugabe von 5 ml H_2O fiel ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert und in HV getrocknet.

Ausbeute: 0.13 g (58 %)

Schmp.: 111-112 °C

DC: $\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HOAc}$; (15:5:4:1), $R_f = 0.3$

IR (KBr): 3902 m, 3281 m, 3082 w, 2957 w, 2236 m, 1673 s, 1633 s, 1607 s, 1577 w, 1565 m, 1508 w, 1450 w, 1436 w, 1393 m, 1364 s, 1334 s, 1314 s, 1269 s, 1217 w, 1203 w, 1162 m, 1078 m, 1023 m, 910 w, 853 w, 818 m, 789 m, 754 m, 711 m

EA: $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_9$ (587.14) \times 0.9 MeOH (616.34)

Ber.: C 54.37, H 4.02, N 15.91

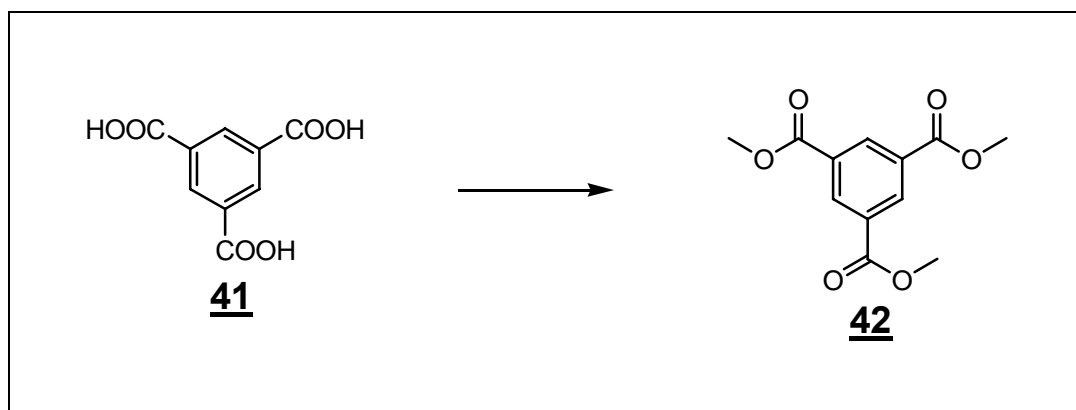
Gef.: C 54.66, H 4.05, N 15.63

^1H -NMR: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz): 3.47 (m, 2H, Ethylenbrücken Dihydroimidazol), 6.38 (d, 1H, $J = 6.8$, 2'-H), 6.96 (t, 1H, $J = 5.0$, 8'-H), 7.26 (t, 1H, $J = 8.0$, 3'-H), 7.41 (m, 2H, 6'-H, 7'-H), 7.51 (t, 1H, $J = 7.7$, 5-H), 7.59 (d, 1H, $J = 7.5$, 4'-H), 7.80 (d, 1H, $J = 6.3$, 4-H), 7.93 (d, 1H, $J = 7.7$, 6-H), 7.80-8.25 (br. s, 2H, mit D_2O austauschbar, Dihydroimidazol NH), 8.51 (br. s, 1H, benzyl.-NH mit D_2O austauschbar), 8.60 (s, 2H, Pik), 9.54 (br. s, 1H, -OH mit D_2O austauschbar)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H -COSY Spektrums: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz)

8.2.8 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl}-phenoxy}-naphth-1-ol 59

8.2.8.1 Synthese von 1,3,5-Benzoltricarbonsäuretrimethylester 42



In einem Dreihalskolben wurden 10 g Tricarbonsäure **41** (47.46 mmol), 31 ml Thionylchlorid (427.18 mmol) und 1 ml DMF zusammengegeben und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach 2 h erhielt man eine gelbe Lösung. Daraufhin wurde überschüssiges Thionylchlorid abdestilliert. Die so erhaltene braune Lösung wurde langsam zu 200 ml in einem Eisbad gekühlten abs. MeOH gegeben. Der hierbei ausfallender gelber Feststoff wurde abgesaugt und aus EtOAc/Hex umkristallisiert. Man erhielt farblose Kristalle.

Ausbeute: 10.05 g (88 %)

Schmp.: 146 °C

DC: EtOAc/Hex (1:1) $R_f = 0,54$

IR(cm^{-1}): 3432 m, 3097 m, 3016 m, 2957 m, 2848 m, 2363 m, 2343 m, 1869 w, 1730 s, 1611 w, 1560 w, 1522 w, 1452 m, 1432 s, 1342 m, 1246 s, 1140 m, 1102 m, 999 s, 928 m, 882 m, 872 m, 801 w, 739 s, 721 m

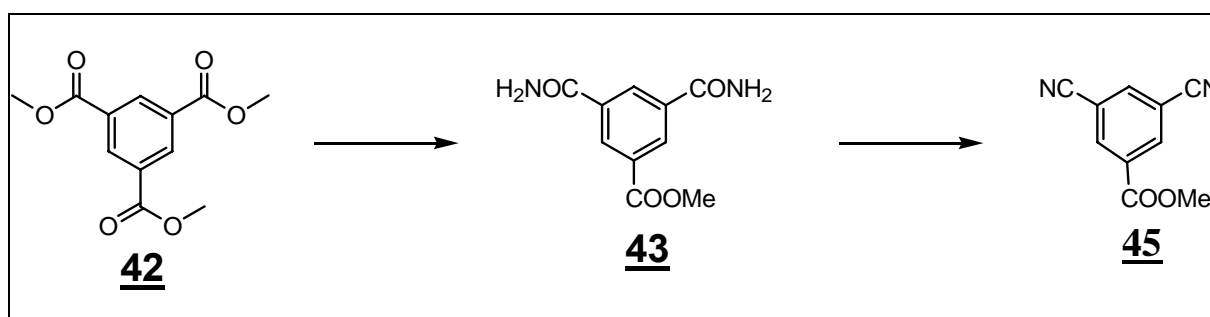
EA: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6$ (252.06)

Ber.: C 57.17, H 4.8

Gef.: C 57.06, H 4.9

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250MHz); 3.92 (s, 9H, OMe), 8.57 (s, 3H, Ar-H)

8.2.8.2 Synthese von 3,5-Dicyano-benzoesäuremethylester **45**



Ein einseitig verschlossener Quarzzylinder wurde in einem mit flüssigem N_2 gefüllten Dewargefäß eingetaucht. Daraufhin wurden 30 ml NH_3 einkondensiert. Anschließend wurden 15 g (59.5 mmol) Tricarbonsäuretrimethylester **42** in dem Quarzzylinder gegeben. Dieser wurde in einer Druckapparatur platziert, verschlossen und bei einer Temperatur von 60 °C gerührt. Der Druck erhöhte sich hierbei auf 25 bar. Dann wurde die Druckapparatur entlüftet und der erhaltene weiße Feststoff in einen 250 ml Dreihalshalskolben überführt. Im Argongegenstrom wurden 60 ml abs. Pyridin zugegeben und auf 2 °C abgekühlt. Anschließend wurden 20 ml POCl_3 (160.3 mmol) über ein Septum zugetropft. Nach 15 min wurde die Lösung bei RT für weitere 30 min gerührt. Mit der Zeit färbte sich die weiße

Suspension violett. Anschließend wurde die Suspension 10 min zum Sieden erhitzt. Hierbei löste sich die violette Suspension auf und man erhielt eine violette Lösung. Diese wurde auf 200 ml HCl saures Eiswasser gegossen und in einem Scheidetrichter mit 400 ml EtOAc ausgeschüttelt. Nach 30 min trennten sich die beiden Phasen. In der organischen Phase bildete sich einen farblosen Feststoff. Dieser wurde abfiltriert, die organischen Phasen im Scheidetrichter abgetrennt und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der erhaltene farblose Feststoff an 150 g Kieselgel säulenchromatographisch (EtOAc/Hex/ CH_2Cl_2 ; 1:10:30%) aufgereinigt.

Ausbeute: 6.5 g (59 %)

Schmp.: 186-187 °C

DC:(EtOAc/Hex/ CH_2Cl_2 ; 1:10:30%) $R_f = 4.3$

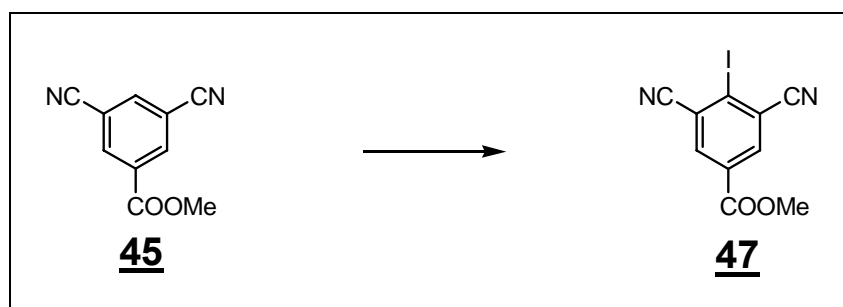
IR(cm^{-1}): 3430 m, 3097 m, 3016 m, 2957 m, 2848 m, 2363 m, 2343 m, 1869 w, 1730 s, 1611 w, 1560 w, 1522 w, 1452 m, 1432 s, 1342 m, 1246 s, 1140 m, 1102 m, 999 s, 928 m, 882 m, 872 m, 801 w, 739 s, 721 m

EA: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ (186.04)

Ber.: C 64.54, H 3.25, N 15.05

Gef.: C 64.32, H 3.65, N 14.80

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250 MHz); 3.92 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 9.12 (s, 2H, 4-H und 6-H), 8.75 (m, 2H, 2-H)

8.2.8.3 Synthese von 3,5-Dicyano-4-iod-benzoesäuremethylester 47

In einem Dreihalskolben wurden 2 g (10.75 mmol) 3,5-Dicyanobenzoic acid methyl ester **45** in 300 ml abs. THF gelöst und bei -90°C in einer Argonatmosphäre 5.4 ml einer 2 M Lösung (10.75 mmol) von LDA in THF innerhalb von 10 min zugetropft. Dabei färbte sich die Lösung dunkelviolett. Nach 30 min wurden 4 g Iod, aufgelöst in 30 ml abs. THF, langsam zu der Reaktionslösung getropft. Hierbei färbte sich die Lösung braun. Nach 2 h wurde die Lösung auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 300 ml EtOAc gelöst und zweimal mit gesättigter Natriumthiosulfat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufarbeitung erfolgte mittels HPLC.

HPLC: Analytisch: Macherey-Nagel Nucleoprep (20 µm, 700 × 50 mm), Gradient:

{Hex/MeOAc 10:1} + 30% CH₂Cl₂

Semipräp.: Arol MN Nucleosil 50-10 2 ml/min, Gradient:

{Hex/MeOAc 10:1} + 30% CH₂Cl₂

Ausbeute: 0.37 g (11 %)

DC:(EtOAc/Hex/CH₂Cl₂; 1:10:30%) R_f = 0.4

Schmp.: 189-190 °C

IR(cm^{-1}): 3674 m, 3648 m, 3427 m, 3058 m, 2950 m, 2232 m, 1908m, 1718 s, 1587 m, 1438 m, 1394 m, 1312 m, 1233 m, 1131 m, 1029 m, 991 m, 950 m, 891 m, 771 m, 762 m, 712 m, 638 m

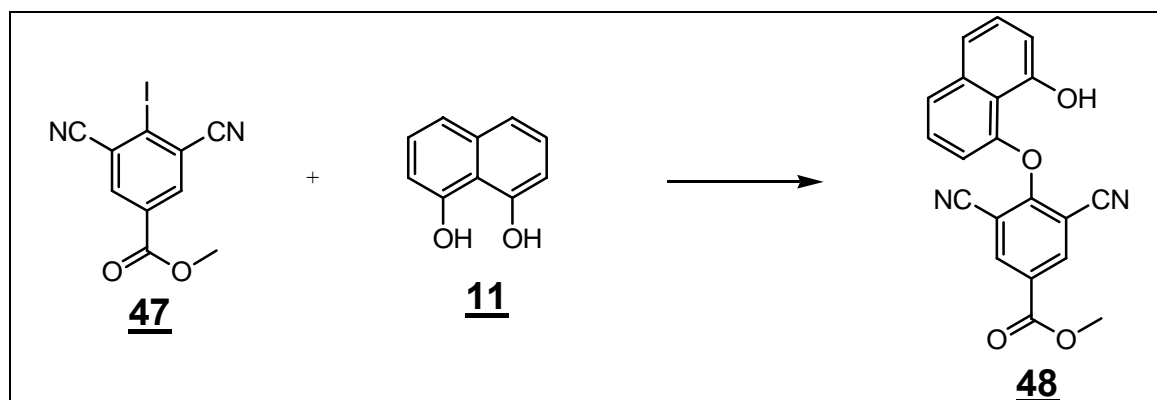
EA: $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{IN}_2\text{O}_2$ (311.94) \times 0.16 EtOAc

Ber.: C:39.18, H:1.94, N:8.59

Gef.: C:38.96, H:2.01, N:8.42

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$; 250MHz): 3.90 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 8.49 (s, 2H, 3-H und 5-H)

8.2.8.4 Synthese von 4-(8'-Hydroxy-naphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzoessäuremethylester **48**



In einem Zweihalskolben wurden 50 mg NaH (1.3 mmol, einer 60%ige Dispersion in Mineralöl) in 2 ml abs. DMF suspendiert. Dazu gab man im Argongegenstrom langsam 0.21 g (1.3 mmol) Diol **11** gelöst in 4 ml abs DMF. Dabei gab es eine heftige Gasentwicklung und die Lösung färbte sich leicht gelb. Nach 30 min wurden zu der Reaktionslösung 0.27 g (0.87 mmol) Iodbenzoesäuremethylester **47**, gelöst in 4 ml abs. DMF, im Argongegenstrom zugetropft. Dabei färbte sich die Lösung schlagartig violett. Dann wurde die Lösung für 30 min bei 60°C weitergerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und auf 10 ml 1M-HCl saures Eiswasser gegossen. Dabei fiel ein grauer, leicht flockiger Feststoff

aus, der sich bei Zugabe von 20 ml EtOAc sofort auflöste. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und im HV getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit 32 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:2) gereinigt. Man erhielt einen leicht gelben Feststoff.

Ausbeute: 0.24 g (82 %)

Schmp.: 207-208 °C

DC: EtOAc/Hex (1:2) $R_f = 0.21$

IR (KBr): 3675 m, 3512 s, 3082 m, 2955 m, 2235 m, 1734 s, 1654 w, 1628 m, 1610 m, 1577 s, 1508 w, 1457 m, 1436 s, 1394 s, 1315 s, 1301 m, 1250 s, 1214 s, 1194 s, 1186 s, 1155 m, 1114 m, 1022 s, 948 w, 920 w, 903 w, 838 w, 821 s, 760s, 724 w, 649 w, 630 w, 613 w, 570 w

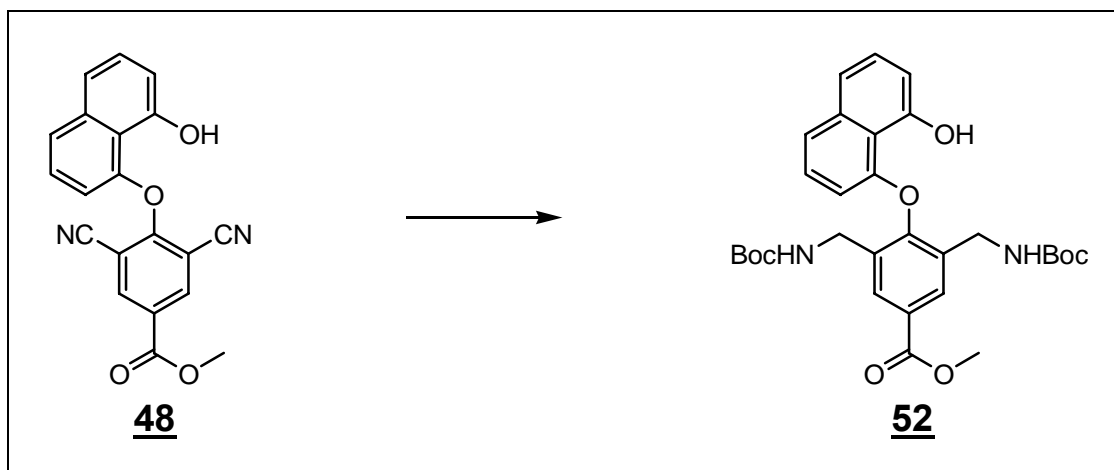
EA: $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ (344.08)

Ber.: C 69.76, H 3.51, N 8.14

Gef.: C 69.53, H 3.81, N 7.86

^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250 MHz): 3.88 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.82 (d, $J = 7.2$, 1H, 2'-H), 7.33 (m, 4H, 3'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H), 7.85 (d, $J = 8.2$, 1H, 4'-H), 8.56 (s, 2H, 2-H, 6-H), 10.08 (s, 1H, -OH)

8.2.8.5 Synthese von 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(*tert*-butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäuremethylester 52



In einem einseitig verschlossenen Quarzzyylinder wurden 65 mg Pd/C, 15 mg PtO₂ und 0.450 g Boc₂O (2.07 mmol) vorgelegt und dann 0.178 g (0.52 mmol) 3,5-Dicyano-benzoesäuremethylester 48, gelöst in 20 ml abs. MeOH, zugegeben. Danach wurde der Quarzzyylinder in Druckapparatur platziert, dreimal mit Argon durchspült, mit H₂ ein Druck von 40 bar eingestellt, verschlossen und die Temperatur auf 55 °C eingestellt. Nach 16 h wurde die Druckapparatur entlüftet, die Lösung über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mit 14 g Kieselgel (EtOAc/Hex, 1:1) gereinigt. Man erhielt einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.20 g (71 %)

Schmp.: 80 °C

DC: EtOAc/Hex, 1:1 R_F = 0.6

IR (KBr): 3335 m, 2930 m, 2220 s, 1710 s, 1604 m, 1527 m, 1458 s, 1393 m, 1367 m, 1294 m, 1249 m, 1169 m, 1025 m, 817 w, 764 w

EA: $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (552,52) \times 0.8 H_2O

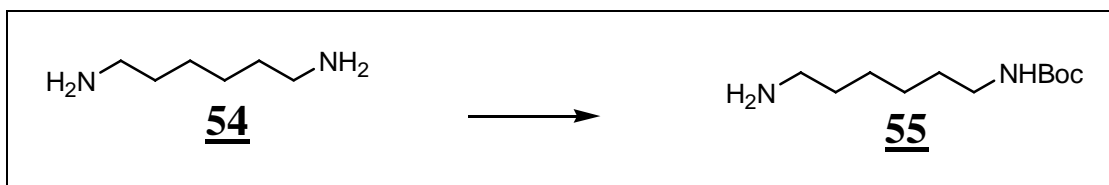
Ber.: C 63.55, H 6.68, N 4.94

Gef.: C 63.58, H 6.49, N 4.77

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250MHz): 1.36 (s, 18H, t-Bu Carbamat), 3.87 (m, 7H, benzyl- CH_2 und OCH_3), 6.12 (d, $J = 7.7$, 1H, 8-H), 6.91 (m, 1H, 2-H), 7.12 (t, $J = 7.7$, 7-H), 7.36 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.48 (d, $J = 8.3$, 6-H), 7.88 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 9.50 (s, 1H, -OH)

MS (ESI $^-$): 551.4 (551.25 berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8^-$)

8.2.8.6 Synthese von (6-Amino-hexyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester 55



In einem Dreihalskolben wurden 2 g (17.2 mmol) 1,6-Diaminhexan **54** in 10 ml abs. THF unter Argonatmosphäre aufgelöst, auf 3°C abgekühlt und langsam 3.7 g Boc_2O (17.2 mmol), ebenfalls gelöst in 20 ml abs. THF, zugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der farblose Rückstand mit 20 g Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$; 1:1:1%) gereinigt. Man erhielt einen öligen farblosen Feststoff.

DC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$; 1:1:1%, $R_f = 0,18$

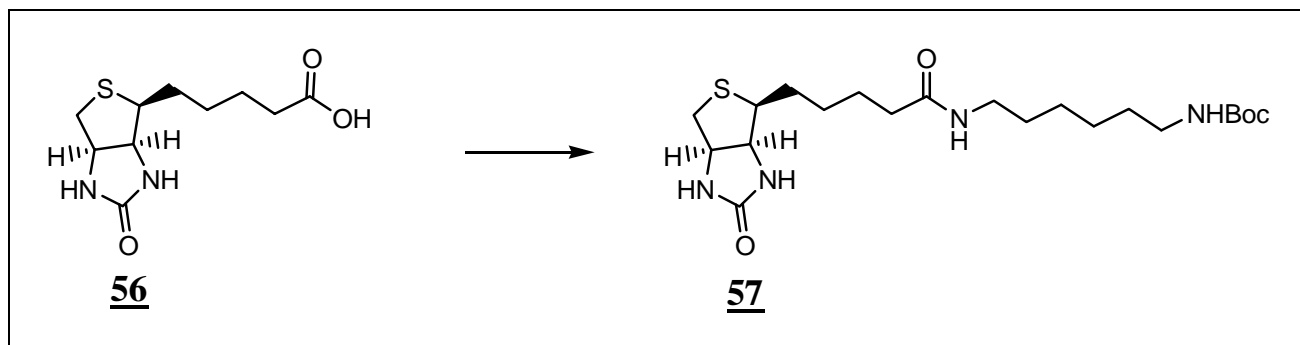
Ausbeute: 1.67 g (45 %)

Schmp.: 82-83 °C

IR (KBr): 3854 m, 3822 m, 3802 m, 3752 m, 3736 m, 3712 m, 3690 m, 3676 m, 3650 m, 3630 m, 3369 w, 2974 w, 2935 w, 2861 w, 2345 s, 1685 w, 1648 w, 1624 w, 1523 w, 1479 w, 1465 w, 1389 w, 1365 w, 1349 w, 1304 w, 1278 w, 1250 w, 1223 m, 1297 m, 1170 w, 1050 s, 1016 s, 994 s, 918 s, 869 s, 821 s, 781 s, 765 s, 730 s, 717 s

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$; 250MHz): 1.24 (m, 19H, t-Bu Carbamat, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H), 2.86 (q, $J = 6.5$, 2H, 6-H), 6.78 (t, 1H, NH t-Bu)

8.2.8.7 Synthese von 6-(+)-Biotinylaminohexylcarbamidsäure-*tert*-butylester 57



In einem Dreihalskolben wurden 0.5 g D(+)-Biotin **56** (2.05 mmol) vorgelegt und in 20 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre suspendiert. Dazu wurden 0.316 ml DIC (3.07 mmol) und 0.414 g HOBt (3.07 mmol) gelöst in 5 ml abs. DMF, zu der Suspension zugegeben. Nach 30 min wurden 0.66 g (3.07 mmol) der Verbindung **55**, gelöst in 10 ml abs. DMF, zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 2 h bei 60 °C gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung auf 100 ml HCl saures Eiswasser gegossen und 100 ml EtOAc zugegeben. Die organischen Phasen wurden voneinander abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene farbloser Feststoff mit 60 g Kieselgel (EtOAc/Hex, 1:2 → Ethanol) gereinigt.

Ausbeute: 0.55 g (61 %)

Schmp.: 168-169 °C

DC: Ethanol R_f = 0.62

IR (KBr): 3648 w, 3628 m, 3317 s, 2933 , 2858 m, 1700 m, 1640 s, 1526 s, 1463 m, 1389 m, 1364 m, 1325 m, 1265m, 1173 m, 1076 w, 1044 w, 869w, 727 w, 682 w

EA: $C_{21}H_{38}N_4O_4S$ (442.26) \times 0.3 H_2O

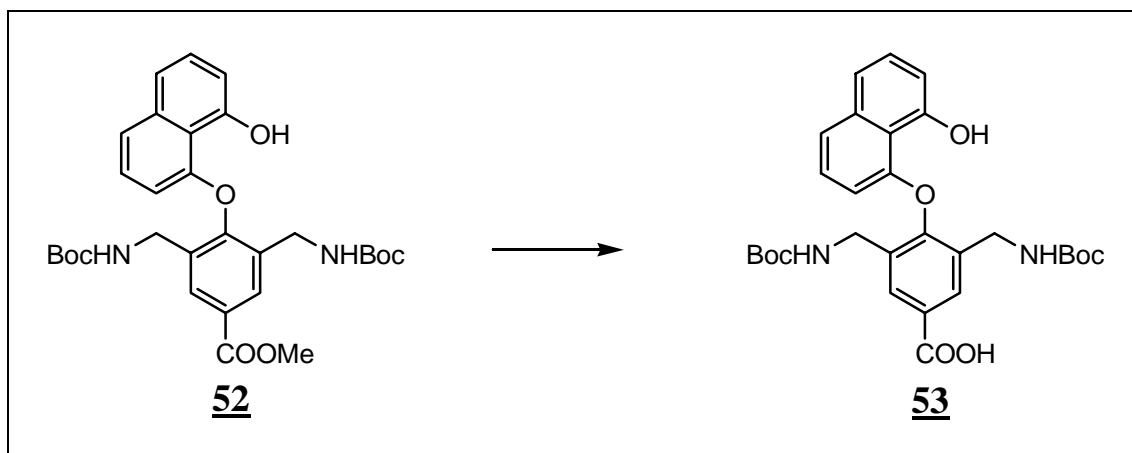
Ber.: C:56.30, H:8.68, N:12.51

Gef.: C:56.25, H:8.52, N:12.75

1H -NMR ($[D_6]$ DMSO; 250MHz): 1.13 (m, 25H, t-Bu Carbamat, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 9'-H, 10'-H, 11'-H), 1.92 (t, 2H, J = 7.2, 12'-H), 2.45 (d, 1H, J = 12.42, 6'-H), 2.69 (m, 4H, 6'-H, 8'-H, 6-H), 4.00 (m, 1H, 5'-H), 4.18 (m, 1H, 4'-H), 6.26 (s, 1H, 1'-NH), 6.32 (s, 1H, 3'-NH), 6,66 (t, 1H, NH t-Bu), 7.62 (t, 1H, J = 5.5, NH Amid)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines 1H - 1H COSY ($[D_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.8.8 Synthese von 8-{2', 6'-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-4'-carboxy-phenoxy-}naphth-1-ol 53



In einem Dreihalskolben wurden 0.13 g (0.235 mmol) zweifach geschütztes Naphthol **52** in 30 ml MeOH/H₂O (3:1) gelöst. Dann wurden 0.03 g (0.70 mmol; 3eq) LiOH × H₂O in 5 ml MeOH/H₂O (3:1) gelöst und langsam zu der Reaktionslösung zugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 1 h bei 60 °C weitergerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml 1 M wässrige HCl-Lösung in einem 100 ml Scheidetrichter überführt und zweimal mit je 20 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und im HV getrocknet.

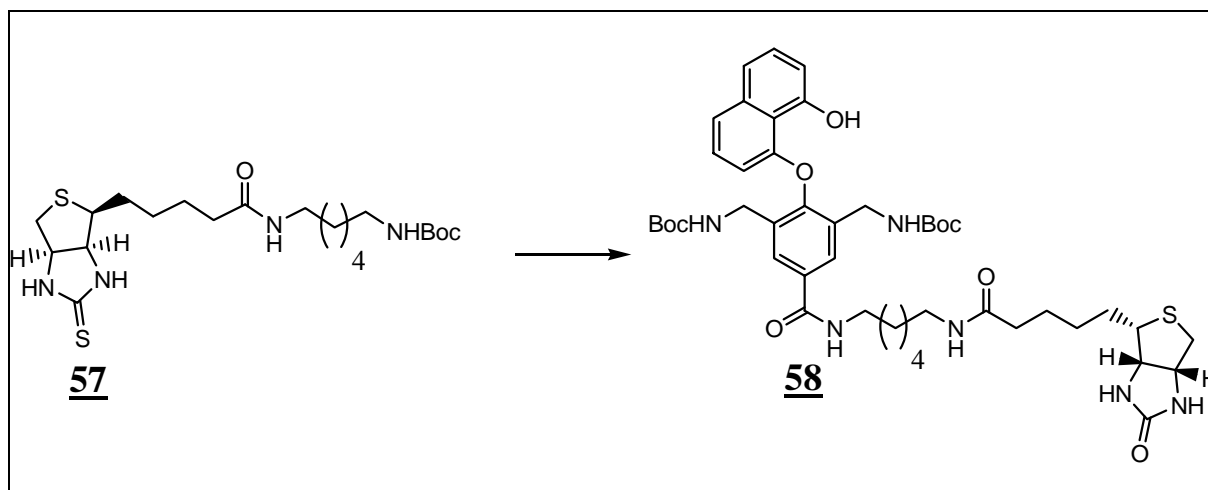
Ausbeute: 0.12 g (99 %)

Schmp.: 140-141 °C

IR (KBr): 3852 w, 3750 w, 3648 w, 3445 m, 2977 w, 2344 w, 1700 w, 1654 w, 1636 w, 1581 w, 1559 w, 1508 w, 1457 w, 1396 w, 1367 w, 1289 w, 1250 w, 1168 w, 1026 w, 817 w, 755 w

¹H-NMR ([D₆]DMSO; 250 MHz): 1.35 (s, 18H, t-Bu Carbamat), 3.92 (m, 4H, benzyl-CH₂), 6.20 (d, J=7.6, 1H, 8-H), 6.91 (t, J = 4.5, 1H, 2-H), 7.18 (t, J = 7.9, 7-H), 7.36 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.48 (d, J=7.9, 6-H), 7.87 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 9.47 (s, 1H, -OH)

8.2.8.9 Synthese von 8-{2', 6'-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl)-phenoxy}-naphth-1-ol 58



In einem Einhalskolben wurden 0.146 g (0.33 mmol) Biotin 57 in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, 1 ml TFA zugegeben und die Lösung für eine 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet.

In einem 100 ml Dreihalskolben wurden 0.12 g (0.22 mmol) Edukt 53 in 4 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst und 0.5 ml NEt₃ zugegeben. Dann wurden 68 µl (0.44 mmol) DIC und 50 mg (0.44 mmol) HOBt gelöst in 2 ml abs. DMF, zu der Reaktionslösung gegeben. Anschließend wurde der Rückstand 57 vom freien Biotin in 4 ml DMF gelöst, im Argongegenstrom ebenfalls zur Reaktionslösung zugetropft und für 2 h bei 60 °C gerührt. Danach wurde die Lösung auf 30 ml salzsaures Eiswasser gegossen und in einem 100 ml Scheidetrichter zweimal mit je 20 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und dann mit 15 g Kieselgel (EtOAc/MeOH; 5:2 +1% NEt₃) gereinigt.

Ausbeute: 0.12 g (61 %)

Schmp.: 179-180 °C

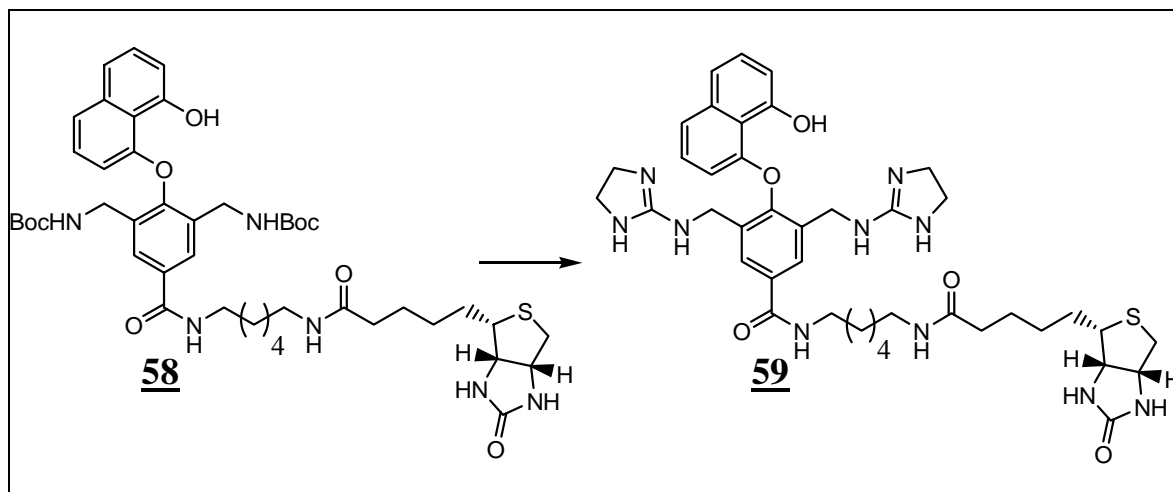
DC: EtOAc/MeOH/NEt₃ (5:2:~1%) R = 0.4

IR (KBr): 3711 w, 3689 w, 3676 w, 3649 w, 3628 w, 3422 w, 2931 w, 2344 w, 1684 m, 1578 w, 1559 w, 1542 w, 1458 w, 1396 w, 1367 w, 1251 w, 1204 w, 1026 w, 800 w, 757 w, 721 w

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$; 250MHz): 1.14 (m, 32H, t-Bu Carbamat, Hexyl-2-H, Hexyl-3-H, Hexyl-4-H, Hexyl-5-H, Biotin-9-H, Biotin-10-H, Biotin-11-H), 2.01(t, 2H, $J = 7.4$, Biotin-12-H), 2.54 (d, 1H, $J = 11.9$, 1H, Biotin-6-H), 2.73 (dd, 1H, $J = 5.0$, Biotin-6-H), 3.01 (m, 3H, Hexyl-6-H, Biotin-8-H), 3.27 (m, 1H, Hexyl-1-H), 3.94 (m, 6H, benzyl- CH_2 , Biotin-4-H, Biotin-5-H), 6.18 (d, 1H, $J = 7.5$, 8-H), 6.36 (s, 1H, Biotin-1-NH), 6.43 (s, 1H, Biotin-3-NH), 6.91 (m, 1H, 2-H), 7.20 (m, 3H, 7-H, benzyl.-NH), 7.38 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.48 (d, 1H, $J = 8.1$, 6-H), 7.77 (m, 3H, 3'-H, 5'-H, NH Hexylamid), 8.51 (t, 1H, NH Biotinamid), 9.45 (s, 1H, -OH)

MS (ESI^+): 863.5 (863.43 gefunden für $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}^+$)

8.2.8.10 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-hexyl)-aminocarbonyl}-phenoxy}-naphth-1-ol 59



Es wurden 54 mg (0.063 mmol) der Biotinverbindung **58** in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst, 1 ml TFA zugegeben und die Lösung 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. Dann wurde der Rückstand in 5 ml MeOH/H₂O/NEt₃ (1:1:1) gelöst und 21 mg (0.14 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben. Nach 16 h wurden zur Reaktionslösung 3 ml 2 M NaOH und 40 ml CH₂Cl₂ zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und zuletzt in 5 ml CH₂Cl₂/MeOH (5:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 0.02 g (43 %)

Schmp.: 181 °C

IR (KBr): 3707 w, 3696 w, 3688 w, 3671 w, 3628 w, 3424 w, 2934 w, 2348 w, 1681 m, 1572 w, 1552 w, 1545 w, 1453 w, 1396 w, 1363 w, 1255 w, 1207 w, 1022 w, 803 w, 756 w

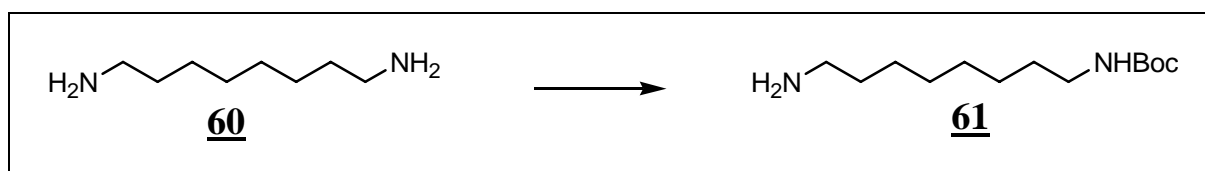
^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO; 250MHz): 1.31 (m, 14H, Hexyl-2-H, Hexyl-3-H, Hexyl-4-H, Hexyl-5-H, Biotin-9-H, Biotin-10-H, Biotin-11-H), 2.02 (2.51 J = 7.4, Biotin-12-H) 2.51 (m, 1H, Biotin-6-H), 2.73 (dd, 1H, J = 5.4, 1H, Biotin-6-H), 3.04 (m, 3H, Hexyl-6-H, Biotin-8-H), 3.16 (m, 10H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol, Hexyl-1-H), 4.12 (m, 6H, benzyl-CH₂, Biotin-4-H, Biotin-5-H), 6.18 (d, 1H, J = 7.6, 8-H), 6.37 (s, 1H, Biotin-1-NH), 6.43 (s, 1H, Biotin-3-NH), 6.99 (t, 1H, J = 4.4, 2-H), 7.17 (t, 1H, J = 8.1, 7-H), 7.40 (d, 2H, J = 4.4, 3-H, 4-H), 7.52 (d, 1H, J = 7.9, 6-H), 7.7-8.4 (br. s, 2H, Imidazol), 7.79 (t, 1H, NH Hexylamid), 8.02 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.6 (t, 2H, benzyl.-NH₂), 8.7 (t, 1H, NH Biotinamid), 9.62 (s, 1H, -OH)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H COSY ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

MS (ESI⁺): 799.5 (799.4 berechnet für C₄₁H₅₅N₁₀O₅S⁺)

8.2.9 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz der Trifluoressigsäure **65**

8.2.9.1 Synthese von (8-Amino-octyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester **61**



In einem Zweihalskolben wurden 0.5 g (3.46 mmol) Diaminooctan **60** in 40 ml abs. THF gelöst und die Lösung auf 3 °C gekühlt. Dann wurden 0.85 g (3.46 mmol) 2-(Boc-oxyimino)-2-phenylacetonitril in 20 ml abs. THF gelöst und langsam bei 3 °C zu der Reaktionslösung zugetropft. Anschließend wurde die Lösung 30 min bei RT weiter gerührt. Danach wurde die Lösung einrotiert, im HV getrocknet und mit 20 g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃; 1:1:1%) gereinigt. Nach dem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, erhielt man eine fast farblose ölige Substanz.

Ausbeute: 0.39 g (43 %)

DC: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (1:1:1%) R_f = 0.12

IR: (KBr) 3363 s, 2978 s, 2930 s, 2852 s, 2156 w, 1686 s, 1647 m, 1562 m, 1522 s, 1477 m, 1390 m, 1365 m, 1319 w, 1267 m, 1248 m, 1174 s, 1061 w, 1043 w, 1014 w, 986 w, 870 m, 781 m, 725 m, 605 m

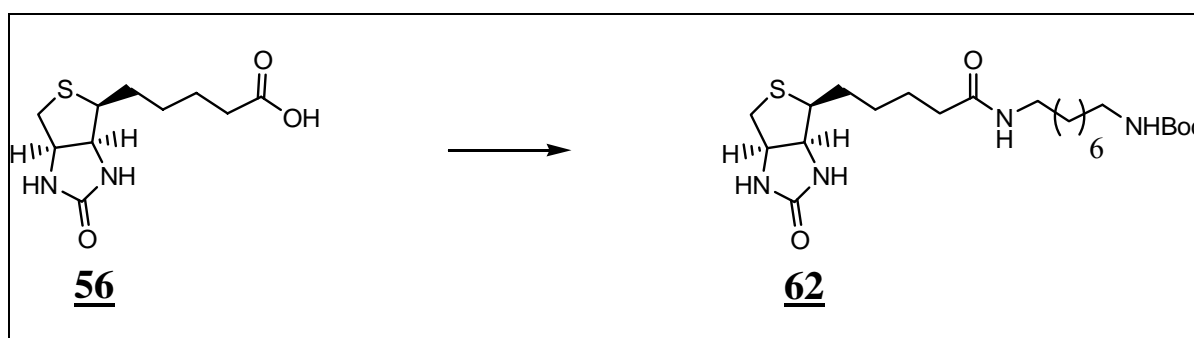
EA: C₁₃H₂₈N₂O₂ (244,22)

Ber.: C 63.89, H 11.55, N 11.46

Gef.: C 63.62, H 11.85, N 11.35

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz); 1.25 (m, 23H, t-Bu Carbamat, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 2.85 (q, 1H, $J = 6.6, 8\text{-H}$), 6.74 (m, 1H, NH, t-Bu)

8.2.9.2 Synthese von 8-(+)-Biotinylaminooctylcarbaminsäure-*tert*-butylester **62**



In einem Zweihalskolben wurden 0.19 g (0,78 mmol) D(+)-Biotin **56** in 2 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst und 0.158 g (1.12 mmol) HOBt in 2 ml abs. DMF aufgelöst und im Argongegenstrom zu der Reaktionslösung zugegeben. Anschließend wurden 0.31 g (1.12 mmol) 1-Amino-8-bocamino-octan **61** in 4 ml abs. DMF gelöst, und ebenfalls in Argongegenstrom zu der Reaktionslösung zugegeben. Anschließend wurden 0.35 ml (2.24 mmol) DIC in Argongegenstrom zu der Reaktionslösung zugegeben. Dann wurde die Reaktionslösung für 3 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Ende der Reaktion wurde die Reaktionslösung auf 150 ml HCl saures Eiswasser gegossen, dabei fiel ein farbloser Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert und im HV getrocknet.

Ausbeute: 0.26 g (70 %)

Schmp.: 174-175 °C

DC: CH₂Cl₂/MeOH (5:1) R_f = 4.2

IR (KBr): 3386 m, 3283 m, 3086 w, 2931 m, 2852 m, 1691 s, 1625 m, 1519 m, 1479 v, 1389 w, 1364 w, 1264 w, 1252 w, 1175 m, 872 w

EA: C₂₃H₄₂N₄O₄S (470,09) × 0,9 H₂O

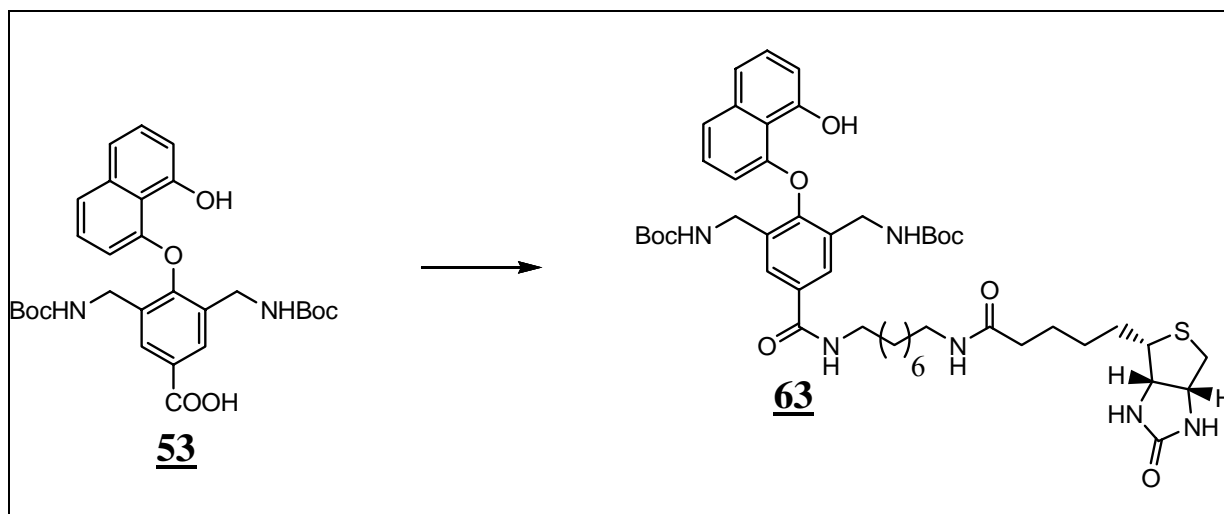
Ber.: C 56.74, H 9.07, N 11.51

Gef.: C 56.86, H 9.03, N 11.36

¹H-NMR: (([D₆] DMSO); 250 MHz), 1.26 (m, 29H, t-Bu Carbamat, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 9'-H, 10'-H, 11'-H), 2.24 (t, 2H, J = 7.3, 12'-H), 2.56 (d, 1H, J = 12.1, 6'-H), 2.80 (m, 4H, 6'-H, 8'-H, 8-H), 4.11 (m, 1H, 5'-H), 4.29 (m, 1H, 4'-H), 6.35 (s, 1H, 1'-NH), 6.41 (s, 1H, 3'-NH), 6.74 (t, 1H, NH t-Bu), 7.69 (t, 1H, J = 5.5, NH Amid)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.9.3 Synthese von 8-{2', 6'-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl}-phenoxy}-naphth-1-ol 63



In einem Einhalskolben wurden 0.34 g (0.72 mmol) Biotin **62** in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, 2 ml TFA zugegeben und die Lösung für eine 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet.

In einem 100 ml Dreihalskolben wurden 0.34 g (0.72 mmol) Edukt **53** in 5 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst und 0.5 ml NEt₃ zugegeben. Dann wurden 0.22 ml (1.44 mmol) DIC und 0.1 g (0.72 mmol) HOBt gelöst in 2ml abs. DMF, zu der Reaktionslösung gegeben. Anschließend wurde der Rückstand von der freien Biotin **62** in 4 ml DMF gelöst und im Argongegenstrom ebenfalls zur Reaktionslösung zugetropft. Dann wurde die Lösung für 1 h bei 60°C gerührt. Dann wurde die Lösung auf 50 ml salzsaures Eiswasser gegossen, der ausfallender farbloser Feststoff abfiltriert, mit Wasser nach gewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 0.35 (83 %)

Schmp.: 118-119 °C

DC: CH₂Cl₂/MeOH (9:1) R_f = 0.38

IR (KBr): 3324 m, 2974 m, 2929 m, 2856 w, 1701 s, 1646 s, 1578 w, 1540 m, 1457 m, 1392 m, 1366 m, 1250 m, 1167 m, 1049 w, 1026 w, 860 w, 817 w, 756 w

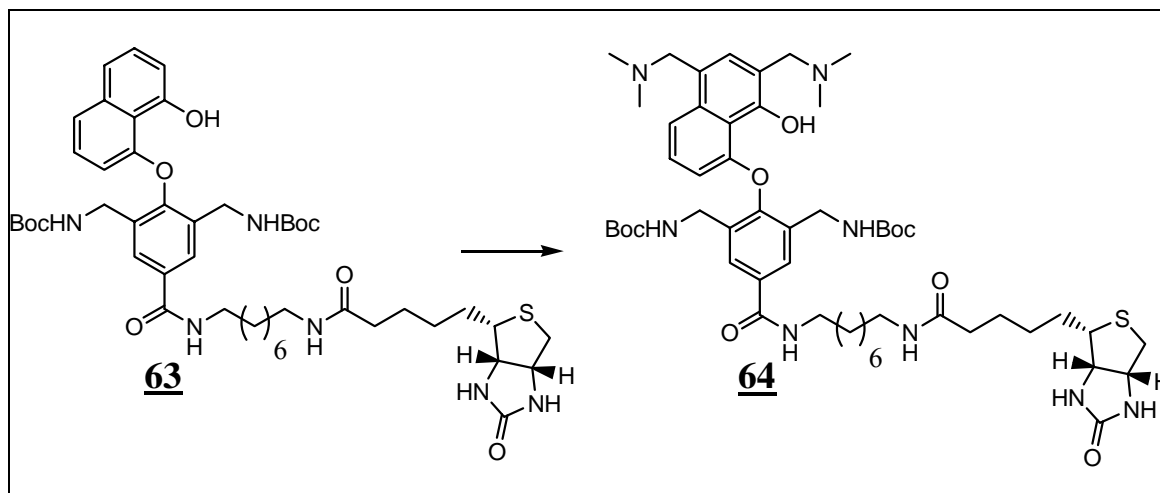
EA: C₄₇H₆₆N₆O₉S (890.46) 2×H₂O

Ber.: C 60.89, H 7.61, N 9.06

Gef.: C 60.76, H 7.31, N 9.07

¹H-NMR ([D₆]DMSO; 250MHz): 1.20 (m, 36H, t-Bu Carbamat, Hexyl-2-H, Hexyl-3-H, Hexyl-4-H, Hexyl-5-H, Hexyl-6-H, Hexyl-7-H, Biotin-9-H, Biotin-10-H, Biotin-11-H), 2.02 (t, 2H, J = 7.25, Biotin-12-H), 2.56 (d, 1H, J = 12.4, Biotin-6-H), 2.79 (dd, 1H, Biotin-6-H), 3.03 (m, 3H, Hexyl-6-H, Biotin-8-H), 3.26 (m, 2H, Hexyl-1-H), 3.92 (m, 6H, benzyl-CH₂, Biotin-4-H, Biotin-5-H), 6.20 (d, J = 7.5, 1H, 8-H), 6.40 (br. s, 2H, Biotin-1-NH, Biotin-3-NH), 6.93 (m, 1H, 2-H), 7.18 (m, 3H, 7-H, benzyl.-NH), 7.37 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.49 (d, J = 8.0, 6-H), 7.70 (t, 1H, J = 5.3, NH Hexylamid), 7.90 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.45 (t, 1H, J = 5.6, NH Biotinamid), 9.42 (br. s, 1H, -OH)

8.2.9.4 Synthese von 8-{2', 6'-Bis(tert-butoxycarbonyl)-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl}-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol 64



In einem Zweihalskolben wurden 0.16 g (0.18 mmol) Edukt 63 in 10 ml abs. MeOH in Argonatmosphäre gelöst und 0.1 ml NEt₃ zugegeben. Dann wurde die Reaktionslösung auf 60 °C erwärmt und 67 mg (0.72 mmol) N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid gelöst in 5 ml abs. MeOH, zugegeben. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 20 g Kieselgel (MeOH/NH₃ (1%)) gereinigt.

Ausbeute: 0.12 g (66%)

Schmp.: 140-142 °C

DC: MeOH/NH₃(1%) R_f = 0.27

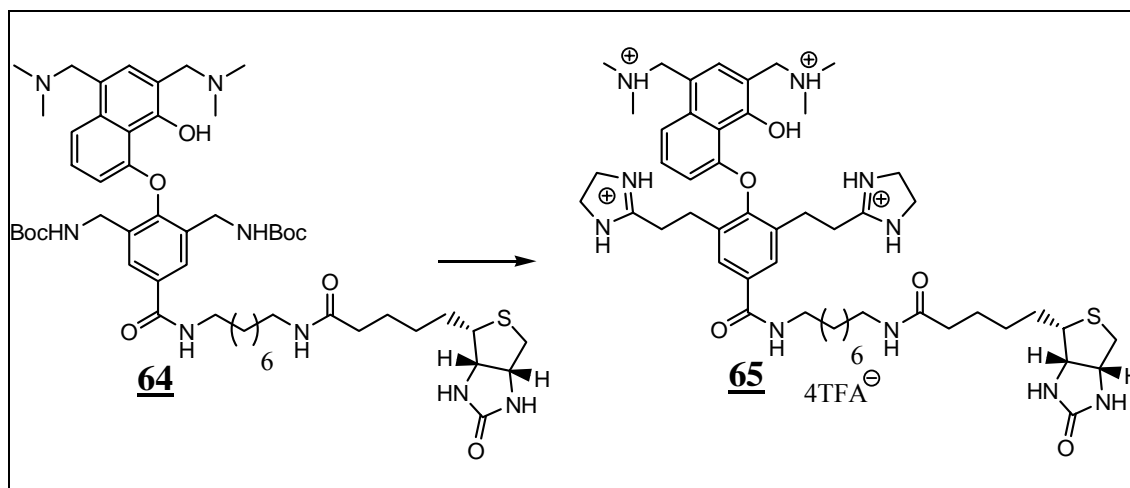
IR (KBr): 3396 m, 3070 w, 2973 w, 2930 m, 2856 w, 1698 s, 1645 m, 1582 w, 1542 m, 1464 m, 1390 w, 1365 w, 1325 w, 1249 m, 1167 m, 1049 w, 1026 w,

¹H-NMR ([D₆]DMSO; 250MHz): 1.15 (m, 36H, t-Bu Carbamat, Hexyl-2-H, Hexyl-3-H, Hexyl-4-H, Hexyl-5-H, Hexyl-6-H, Hexyl-7-H, Biotin-9-H, Biotin-10-H, Biotin-11-H), 1.92

(t, 2H, $J = 7.3$, Biotin-12-H), 2.52 [m, 13H, $N-(CH_3)_2$, Biotin-6-H], 2.56 (dd, 2H, $J = 4.4$, Biotin-6-H), 2.91-3.23 (m, 5H, Hexyl-1-H, Hexyl-8-H, Biotin-8-H), 3.82 (m, 10H, $N-CH_2$, benzyl- CH_2 , Biotin-3-H, Biotin-4-H), 6.18 (d, 1H, $J = 7.4$, 8-H), 6.39 (s, 1H, Biotin-1-NH), 6.41 (s, 1H, Biotin-1-NH), 7.19 (m, 3H, 7-H, benzyl.-NH), 7.41 (m, 2H, 3-H, 6-H), 7.72 (t, 1H, $J = 5.3$, NH Hexylamid) 7.81 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.46 (t, 1H, $J = 5.6$, NH Biotinamid), 8.9 (br. s, 1H, -OH)

MS (ESI^+): 1004.8 (1005.58 berechnet für $C_{53}H_{81}N_8O_9S^+$)

8.2.9.5 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(6-(+)-biotinylamino-octyl)-aminocarbonyl}-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz der Trifluoressigsäure **65**



In einem Rundkolben wurden 0.1 g (0.1 mmol) Edukt **64** in 15 ml CH_2Cl_2 aufgelöst und 1 ml TFA zugegeben. Nach 3 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand im HV getrocknet, dann in 50 ml $H_2O/MeOH$ (1:1) gelöst und in einen Dreihalskolben überführt. Hinzu wurden 1 ml einer 99 %ige NEt_3 -Lösung zugegeben und die Lösung für 1 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurden zur Reaktionslösung 33 mg (0.2 mmol)

Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17**, aufgelöst in 5 ml H₂O, zugegeben und für 34 min bei 60 °C weitergerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, im HV getrocknet und mittels präoperativen reversed phased HPLC gereinigt.

HPLC: Analytisch: Maisch Reprosil-Pur RP C18-AQ (10μ, 250 × 20 mm), Gradient:

H₂O/MeCN 75:25 + 1 % TFA, Detektion: 275 nm,

Semipräp.: Merck Lichrosorb Select B, H₂O/MeCN 75:25 + 1 % TFA

Retentionszeit: 5.08 min.

Ausbeute: 32 mg (27 %)

Schmp.: 211 °C

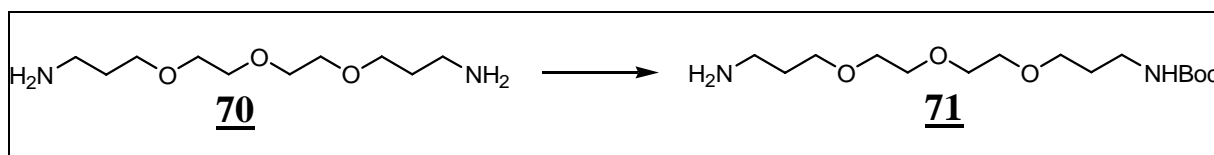
IR (KBr): 3421 m, 3276 m, 2930 m, 2856 w, 1668 s, 1608 w, 1545 w, 1458 m, 1369 m, 1201 m, 1178 w, 1131 w, 1068 w, 1034 m, 826 w

¹H-NMR ([D₆]DMSO; 250MHz): 1.30 (m, 18H, Hexyl-2-H, Hexyl-3-H, Hexyl-4-H, Hexyl-5-H, Hexyl-6-H, Hexyl-7-H, Biotin-9-H, Biotin-10-H, Biotin-11-H), 2.02 (t, 2H, J = 7.2, Biotin-12-H), 2.52 [m, 12H, N-(CH₃)₂,], 2.56 (d, 2H, J = 12.5, Biotin-6-H), 2.79 (dd, 1H, J = 3.6, Biotin-6-H) 2.99 (m, 3H, Hexyl-8-H, Biotin-8-H), 3.29 (m, 10H, Ethylenbrücken-Dihydroimidazol, Hexyl-1-H), 4.11-4.34 (m, 10H, N-CH₂, benzyl-CH₂, Biotin-4-H, Biotin-5-H), 6.24 (d, 1H, J = 7.5, 8-H), 6.42 (br. s, Biotin-1-NH, Biotin-3-NH, austauschbar mit D₂O), 7.17 (t, 1H, J = 8.0, 7-H), 7.51 (s, 1H, 3-H), 7.51 (d, J = 7.9, 6-H), 7.7-8.2 (br. s, 2H, N-H Imidazol, austauschbar mit D₂O), 7.74 (t, 1H, J = 5.4, NH Hexylamid, austauschbar mit D₂O) 7.99 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.46 (t, 2H, J = 5.4, benzyl.-NH, austauschbar mit D₂O), 8.58 (t, 1H, NH Biotinamid, austauschbar mit D₂O), 10.25 (br. s, 1H, -OH, austauschbar mit D₂O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.10 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Trifluoressigsäure 75

8.2.10.1 Synthese von 13-Amino-(4, 7, 10-trioxoTridecanyl)-carbaminssäure-*tert*-butylester 71



In einem Zweihalskolben wurden 2 ml (9.08 mmol) 1,13-Diamino-4, 7, 10-trioxatridecan 70 in 80 ml abs. THF gelöst und die Lösung auf 3 °C abgekühlt. Dann wurden 2.24 g (9.08 mmol) 2-(Boc-oxyimino)-2-phenylacetonitril in 40 ml abs. THF gelöst und langsam zu der Reaktionslösung zugetropft. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei RT weiter gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 50g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃; 1:1:1%) gereinigt. Man erhielt ein fast farbloses Öl.

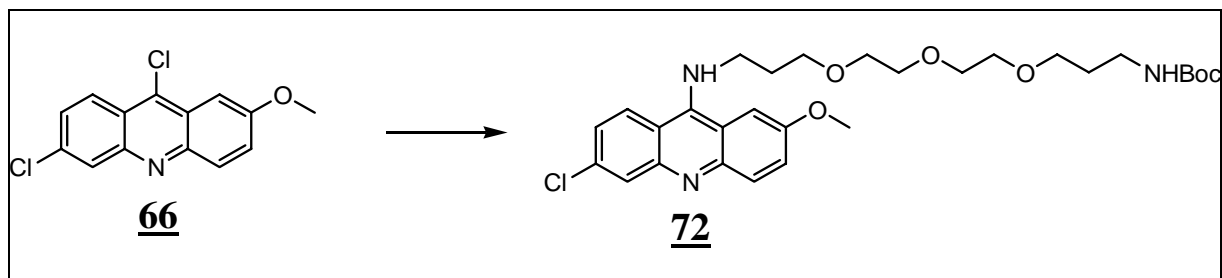
Ausbeute: 1.20 g (41 %)

DC: CH₂Cl₂/MeOH (1:1:+ 1% NEt₃) R_f = 0.19

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250MHz): 1.38 (s, 9H, *t*-Bu Carbamat), 1.52 (q, 2H, J = 6.6, 2-H), 2.56 (t, 2H, J = 6.8, 13-H), 2.90 (q, 2H, J = 6.4, 1-H), 3.36 (m, 14H, 3-H, 5-H, 6-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H), 6.75 (t, 1H, J = 7.8, NH *t*-Bu)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.10.2 Synthese von 13-(6-Chloro-2-methoxy-anthracen-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-yl-carbaminsäure-tert-butylester 72



In einem Dreihalskolben wurden unter Argonatmosphäre 0.5 g (1.8 mmol) 6,9-Dichlor-2-methoxyacridin **66** und 1.25 g (13 mmol) Phenol zusammen gegeben. Dann wurden zu der Reaktionslösung unter Argongegenstrom 0.58 g (1.8 mmol) 1-Amino-13-Boc-4, 7, 10-trioxatridecan **71** gelöst in 50 ml abs. Dioxan, zugegeben und die Lösung für 24 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 80 g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH; 24:1 → 6:1) gereinigt. Man erhielt eine gelbe ölige Substanz.

Ausbeute: 0.68 g (67 %)

Schmp.: 80-82 °C

DC: CH₂Cl₂/MeOH (9:1) R_f = 0.25

IR (KBr): 2870 w, 1693 s, 1630 m, 1588 m, 1566 m, 1503 w, 1392 w, 1365 m, 1273 w, 1248 m, 1200 m, 1173 m, 1128 m, 933 m, 862 w, 829 m, 799 m, 764 w, 718 m, 670 w, 564 w

EA: C₂₉H₄₀ClN₃O₆ (561.26) × 3 H₂O

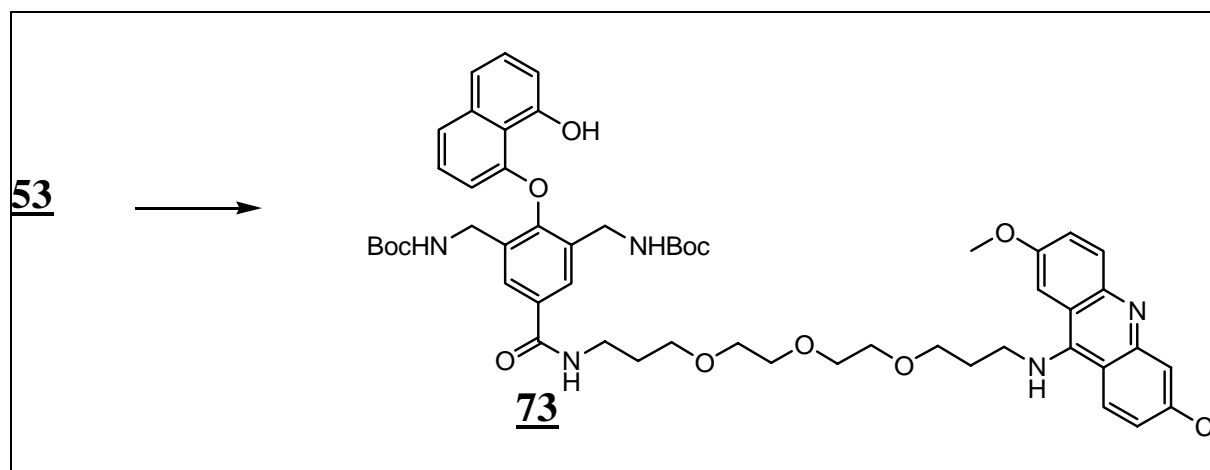
Ber.: C 56.53, H 7.52, N 6.82

Gef.: C 56.49, H 7.69, N 6.64

^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250MHz): 1.35 (s, 9H, t-Bu Carbamat), 1.53 (t, 2H, $J = 6.8$, 2-H), 2.05 (t, 2H, $J = 6.5$, 12-H), 2.89 (q, 2H, $J = 6.8$, 1-H), 3.3-3.47 (m, 10H, 3-H, 5-H, 6-H, 8-H, 9-H), 3.52 (t, 2H, $J = 5.8$, 11-H), 3.95 (s, 3H, O-Me), 4.03 (t, 2H, $J = 6.9$, 13-H), 6.71 (t, 1H, $J = 7.6$, NH t-Bu), 7.44 (d, 1H, $J = 9.2$, 7'-H), 7.59 (d, 1H, $J = 9.2$, 3'-H), 7.78 (s, 1H, 1'-H), 7.80 (d, 1H, $J = 9.3$, 4'-H), 7.84 (s, 1H, 5'-H), 8.44 (d, $J = 9.3$, 8'-H)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H COSY ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.10.3 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-(*tert*-Butoxycarbonylaminomethyl)-4-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)- 4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-naphth-1-ol 73



In einem Einhalskolben wurden 0.112 g (0.2 mmol) PEG-Acridin **72** in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst und 1 ml TFA zugegeben. Die Lösung wurde für 2 h bei RT gerührt, dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet, mit 5 ml abs. DMF erneut gelöst und 0.1 ml NEt_3 zugegeben. In einem Zweihalskolben wurden 0.1 g (0.18 mmol) Edukt **53** in 6 ml abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst und 27 mg (0.2 mmol) HOBt gelöst in 4 ml abs. DMF, zugegeben. Anschließend wurde zur dieser Reaktionslösung die Lösung mit

dem geschützten PEG-Acridin, zugegeben, und auf 60 °C erwärmt, 62 µl (0.4 mmol) DIC zugegeben und eine weitere Stunde bei 60 °C weiter gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf 50 ml HCl saures Eiswasser gegeben, der ausgefallene gelbliche Feststoff abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen, im HV getrocknet und mit 16 g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH; 20:1 → 9:1 → 5:1) gereinigt. Man erhielt einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 0.11 g (63 %)

Schmp.: 94-96 °C

DC: CH₂Cl₂/MeOH (9:1) R_f = 0,5

IR (KBr): 3444 s, 2926 m, 2866 m, 2368 w, 1708 s, 1630 m, 1578 w, 1560 w, 1522 m, 1393 m, 1365 m, 1365 m, 1247 s, 1168 m, 1120 w, 1027 m, 930 w, 862 w, 817 w, 756 w

EA: C₅₃H₆₄ClN₅O₁₁ (981,43) × 2.7 H₂O

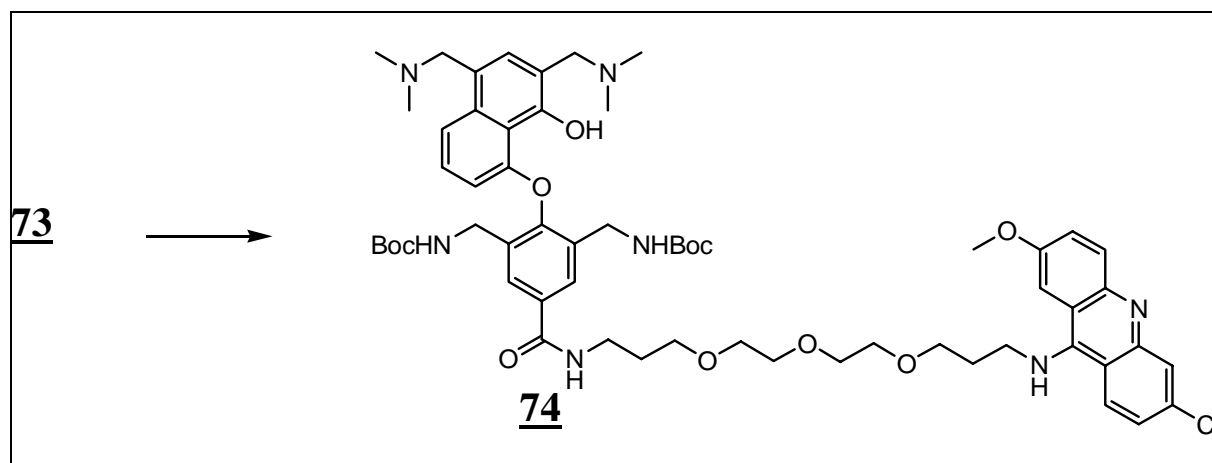
Ber.: C 61.73, H 6.78, N 6.79

Gef.: C 61.82, H 6.49, N 6.50

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250 MHz); 1.34 (s, 18H, t-Bu Cabamat), 1.71 (t, 2H, J = 6.5, Tridecanyl-2-H), 2.09 (t, 2H, J = 6.6, Tridecanyl-12-H), 3.32 (m, 12H, Tridecanyl-1-H, Tridecanyl-3-H, Tridecanyl-5-H, Tridecanyl-6-H, Tridecanyl-8-H, Tridecanyl-9-H), 3.53 (t, 2H, J = 5.7, Tridecanyl-11-H), 3.89 (m, 9H, benzyl-CH₂, O-Me, Tridecanyl-13-H), 6.19 (d, 1H, J = 8.5, 8-H), 6.93 (m, 1H, 2-H), 7.17 (m, 3H, benzyl.-NH, 7-H), 7.39 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.41 (d, 1H, J = 9.4, Acridin-7-H), 7.62 (d, 1H, J = 9.3, Acridin-3-H), 7.77 (m, 4H, 6-H, Acridin-1-H, Acridin-4-H, Acridin-5-H), 7.96 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.48 (m, 2H, Acridin-8-H, NH Acridinamid), 8.7-9.3 (br. s NH Tridecanylamid), 9.44 (s, 1H, -OH)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.10.4 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-(*tert*-Butoxycarbonylaminomethyl)-4-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)- 4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol 74



In einem Zweihalskolben wurden 60 mg (0.06 mmol) Edukt **73** unter Argonatmosphäre in 8 ml abs. MeOH gelöst und 0.1 ml NEt₃ zugegeben. Dann wurde die Reaktionslösung auf 60 °C erwärmt und 13 mg (0.13 mmol) N, N-Dimethylmethyleniminiumchlorid, gelöst in 2 ml abs. MeOH, zugegeben. Nach 10 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit 6 g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH; 3:1: +1% NH₃ → 1:1 → MeOH/NH₃ (1%)) gereinigt. Man erhielt einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 0.05 g (77 %)

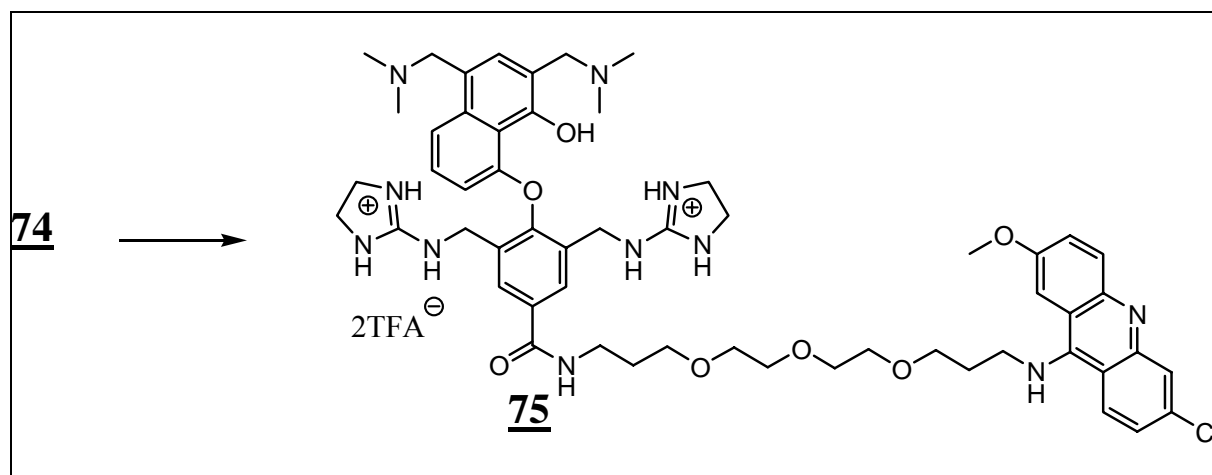
Schmp.: 109-110 °C

DC: CH₂Cl₂/MeOH (1:1:1% NH₃) R_f = 0,13

IR (KBr): 3904 m, 3880 m, 3864 s, 3822 m, 3810 s, 3755 m, 3730 m, 3716 s, 3690 m, 3670 m, 3633 w, 3370 m, 2930 w, 2860 w, 2350 s, 1683 w, 1631 m, 1587 w, 1520 w, 1502 w, 1490 w, 1390 m, 1367 s, 1252 w, 1203 w, 1178 w, 1133 w, 1038 m, 930 m, 831 s, 806 s, 760 m, 722 s

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz); 1.33 (s, 18H, t-Bu Cabamat), 1.72 (t, 2H, $J = 6.3$, Tridecanyl-2-H), 2.11 (t, 2H, $J = 6.8$, Tridecanyl-12-H), 2.51 (m, 12H, $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$), 3.41 (m, 12H, Tridecanyl-1-H, Tridecanyl-3-H, Tridecanyl-5-H, Tridecanyl-6-H, Tridecanyl-8-H, Tridecanyl-9-H), 3.57 (t, 2H, $J = 5.9$, Tridecanyl-11-H), 4.11 (m, 13H, benzyl- CH_2 , N-CH_2 , O-Me, Tridecanyl-13-H), 6.31 (d, 1H, $J = 8.5$, 8-H), 7.13 (t, 1H, $J = 6.9$, 7-H), 7.56 (d, 2H, $J = 9.5$, Acridin-7-H), 7.78 (d, 1H, $J = 9.4$, Acridin-3-H), 7.77 (m, 4H, 6-H, Acridin-1-H, Acridin-4-H, Acridin-5-H), 7.96 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.39 (t, 2H, $J = 5.2$, benzy-NH), 8.61 (m, 2H, Acridin-8-H, NH Acridinamid), 9.72 (br. s NH Tridecanylamid), 10.01 (s, 1H, -OH)

8.2.10.5 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-4'-(13-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-ylamino)-4, 7, 10-trioxotridecan-1-ylaminocarbonyl)-1-phenoxy}-2,4-bis-dimethylaminomethyl-naphth-1-ol, Salz mit Trifluoressigsäure **75**



In einem Einhalskolben wurden 30 mg (0.027 mmol) Edukt **74** in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst, 0.5 ml TFA zugegeben und die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet, mit 12 ml $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1) erneut gelöst und 0.5 ml NEt_3 zugegeben. Dann wurde die Lösung auf 60 °C erwärmt und 9 mg (0.06 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 34 min bei 60 °C weiter gerührt. Dann wurde das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mittels präoperativen reversed phase HPLC gereinigt. Man erhielt einen gelben Feststoff.

HPLC: Analytisch: Maisch Reprosil-Pur RP C18-AQ (10 μ , 250 \times 20 mm), Gradient:

H₂O/MeCN 72:28 + 1 % TFA, Detektion: 275 nm

Semipräp.: Merck Lichrosorb Select B, H₂O/MeCN 72:28 + 1 % TFA

Retentionszeit: 5. 24 min.

Ausbeute: 10 mg (25 %)

Schmp.: 114-115 °C

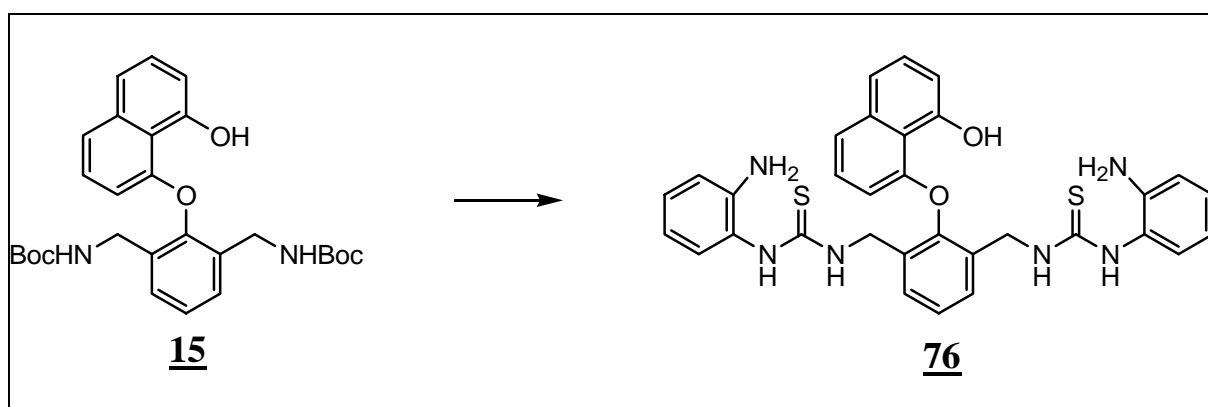
IR (KBr): 3903 m, 3870 m, 3853 m, 3838 m, 3821 m, 3806 m, 3750 m, 3734 m, 3711 m, 3689 m, 3675 m, 3648 m, 3628 m, 3368 w, 2933 w, 2863 w, 2344 s, 1684 w, 1636 w, 1589 w, 1526 w, 1499 w, 1458 w, 1388 m, 1365 m, 1249 w, 1201 w, 1176 w, 1130 w, 1036 w, 933 s, 830 s, 800 s, 763 s, 720 s, 670 s

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250 MHz); 1.71 (t, 2H, J = 6.5, Tridecanyl-2-H), 2.09 (t, 2H, J = 6.7, Tridecanyl-12-H), 2.49 [m, 12H, N-(CH₃)₂], 3.33 (s, 8H, Ethylenbrücken Dihydroimidazol), 3.41 (m, 14H, Tridecanyl-1-H, Tridecanyl-3-H, Tridecanyl-5-H, Tridecanyl-6-H, Tridecanyl-8-H, Tridecanyl-9-H, Tridecanyl-11-H), 3.96 (s, 3H, OMe), 4.04 (s, 2H, N-CH₂), 4.11 (s, 2H, N-CH₂), 4.16 (m, 2H, Tridecanyl-13-H), 4.23 (m, 4H, benzyl-CH₂), 6.16 (d, 1H, J = 7.6, 8-H), 7.11 (d, 1H, J = 8.0, 7-H), 7.33 (s, 1H, 3-H), 7.52 (d, 1H, J = 9.2, Acridin-7-H), 7.71 (d, 1H, J = 9.4, Acridin-3-H), 7.80 (d, 1H, J = 9.2, 6-H), 7.85 (m, 4H, Acridin-1-H, Acridin-4-H, Acridin-5-H, 6-H), 7.93 (s, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.9-8.3 (br. s, 2H, N-H Imidazol, austauschbar mit D₂O), 8.39 (t, 2H, J = 5.4, benzy-NH, austauschbar mit D₂O), 8.52 (m, 2H, Acridin-8-H, NH Acridinamid, austauschbar mit D₂O), 9.61 (br. s, 1H, Tridecanylamid, austauschbar mit D₂O), 10.21 (s, 1H, -OH, austauschbar mit D₂O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.11 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 77

8.2.11.1 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[N-(2-aminophenyl)-thioureidomethyl]-phenoxy}-naphth-1-ol 76



In einem Einhalskolben wurden 0.2 g (0.4 mmol) der Naphtholverbindung 15 in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und 1 ml TFA zugegeben. Nach 3 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet, erneut in 20 ml abs. EtOH gelöst und in einen Dreihalskolben überführt. Dann wurde die Lösung unter Argonatmosphäre auf 3 °C abgekühlt und 0.1 g Imidazol zugegeben. In einem Einhalskolben wurden 0.22 g (1.2 mmol) 1,1'-Thiocarbonyldimidazol in 10 ml abs. EtOH gelöst und im Argongegenstrom zur Reaktionslösung zugegeben. Nach 10 min wurde die Lösung dann bei RT weitergerührt. Nach 4 h wurden zur Reaktionslösung 0.13 g (1.2 mmol, 3eq) 1,2-Phenylendiamin gelöst in 10 ml abs. EtOH, im Argongegenstrom zugegeben. Die Reaktionslösung wurde dann für 12 h bei RT weiter gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltener Rückstand im HV getrocknet und mit 40 g Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH; 20:1: + 1% NEt₃) gereinigt. Man erhielt einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.14 g (60 %)

DC: CH₂Cl₂/MeOH (20:1: + 1 % NH₃) R_f = 0.11

Schmp.: 145-146 °C

IR (KBr): 3356 m, 1724 w, 1618 m, 1578 m, 1531 s, 1498 s, 1455 m, 1395 m, 1300 w, 1248 m, 1182 w, 1168 w, 1077 w, 1026 m, 960 w, 850 w, 817 m, 753 s

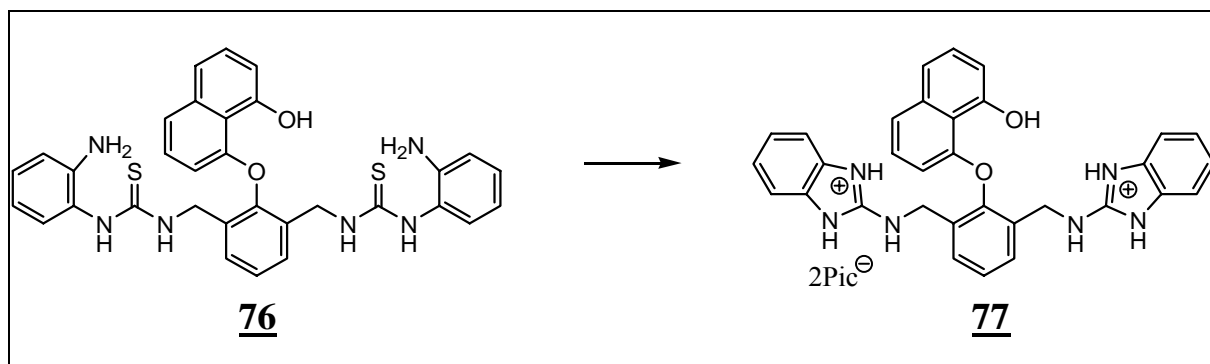
EA: C₃₂H₃₀N₆O₂S₂ (594.19) × 1eq MeOH

Ber.: C 64.19, H 5.08, N 14.13

Gef.: C 64.25, H 6.02, N 14.97

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250 MHz) 4.07 (m, 4H, benzyl-CH₂), 4.84 (m, 4H, NH₂, austauschbar mit D₂O), 6.33 (d, 1H, J = 7.8, 8-H), 6.51 (t, 2H, J = 4.1, Benzimidazol-4-H), 6.73 (d, 2H, J = 7.1, Benzimidazol-3-H), 6.89-7.00 (m, 5H, 2-H, Benzimidazol-5-H, Benzimidazol-6-H), 7.17 (t, 1H, J = 8.0, 7-H), 7.38-7.47 (m, 5H, 3-H, 4-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.45 (d, J = 7.4, 6-H), 7.51 (br. s, 2H, benzyl-NH austauschbar mit D₂O), 8.95 (s, 2H, Thioharnstoff-NH, austauschbar mit D₂O), 9.32 (s, 1H, -OH, austauschbar mit D₂O)

8.2.11.2 Synthese von 8-{2', 6'-Bis-[(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure **77**



In einem Zweihalskolben wurden 0.12 g (0.2 mmol) Edukt **76** in 20 ml abs. MeOH gelöst und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden portionsweise über 3 h 0.17 g (0.8 mmol) HgO und 0.01 g S zur Reaktionslösung zugegeben. Die Lösung wurde über Celite abfiltriert, das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 10 g Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$; 20:1:1% \rightarrow 5:1:1%) gereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet, der Rückstand erneut in 10 ml MeOH gelöst und zu dieser Lösung 0.1 g Pikrinsäure gelöst ebenfalls in 5 ml MeOH, zugegeben. Anschließend wurde zu der gelben Lösung 10 ml H_2O zugegeben. Daraufhin fiel ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser nach gewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 77 mg (77 %)

Schmp.: 178-179 °C

IR (KBr): 3462 w, 3181 m, 1674 s, 1611 s, 1565 m, 1477 w, 1430 w, 1363 m, 1335 s, 1313 s, 1270 m, 1192 w, 1161 w, 1078 w, 1078 w, 911 w, 819 w, 787 w, 743 m, 711 w

EA: $\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ (984.21) \times 2.6 MeOH

Ber.: C 52.40, H 4.00, N 15.74

Gef.: C 52.40, H 4.27, N 15.79

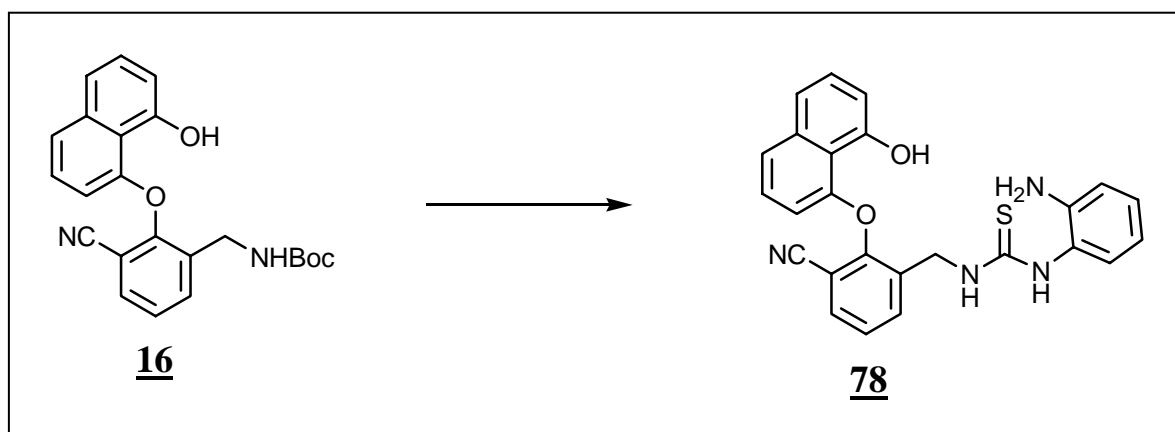
^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz) 4.45 (m, 4H, benzyl- CH_2), 6.32 (d, 1H, $J = 7.6$, 8-H), 6.72 (m, 1H, 2-H), 7.17-7.28 (m, 11H, 3-H, 4-H, 7-H, Benzimidazol-3-H, Benzimidazol-4-H, Benzimidazol-5-H, Benzimidazol-6-H), 7.40 (m, 2H, 6-H, 4'-H), 7.60 (d, 2H, $J = 7.6$, 3'-H, 5'-H), 8.58 (s, 4H, Pikrat), 9.2 (t, 2H, benzyl.-NH austauschbar mit D_2O), 12.51 (br. s, 2H, Benzimidazol-NH austauschbar mit D_2O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H COSY ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

MS (ESI^+): 527.4 (527.2 berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{N}_6^+$)

8.2.12 Synthese von 8-{2-[(1H-Benzimidazol-2-ylamino)-methyl]-6-[(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphthalin-1-ol, Salz mit Pikrinsäure 82

8.2.12.1 Synthese von 8-[N-(2-aminophenyl)-thioureidomethyl]-1'-cyano-8-hydroxy-naphth-1-ol 78



In einem Kolben wurden 0.8 g (2.05 mmol) der einfach reduzierten Nitrilverbindung **16** in 40 ml CH₂Cl₂ gelöst und 1 ml TFA zugegeben. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. In einem weiteren Dreihalskolben wurden 0.55 g (3.1 mmol) 1, 1'-Thiocarbonyldiimidazol in 15 ml abs. MeOH gelöst und 0.1 g Imidazol zugegeben. Dieser Reaktionskolben wurde mit Argon beschickt und die Lösung auf 3 °C abgekühlt. Anschließend wurde der Rückstand der entschützten Nitrilverbindung in 15 ml abs. MeOH gelöst und im Argongegenstrom zur Reaktionslösung zugegeben. Nach 10 min wurde die Lösung für 4 h bei RT weitergerührt. Dann wurden zu der Reaktionslösung 0.33 g (3.1 mmol) 1,2-Phenylendiamin, gelöst in 10 ml abs. EtOH, in Argongegenstrom zugegeben. Die Reaktionslösung wurde dann für 12 h bei RT weiter gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, im HV getrocknet und mit 56 g Kieselgel (Hex/EtOAc; 1:1) gereinigt. Man erhielt einen grauen Feststoff.

Ausbeute: 0.81 g (98 %)

DC: Hex/EtOAc; 1:1R_f = 0.29

Schmp.: 117-120 °C

IR (KBr): 3456 s, 2924 w, 2233 m, 1617 m, 1609 m, 1576 m, 1528 s, 1508 m, 1498 m, 1450 m, 1394 s, 1299 w, 1246 s, 1199 m, 1156 w, 1079 w, 1023 m, 966 w, 852 w, 816 m, 752 s

EA: C₂₅H₂₀N₄O₂S (440.13) × 1.4 EtOAc

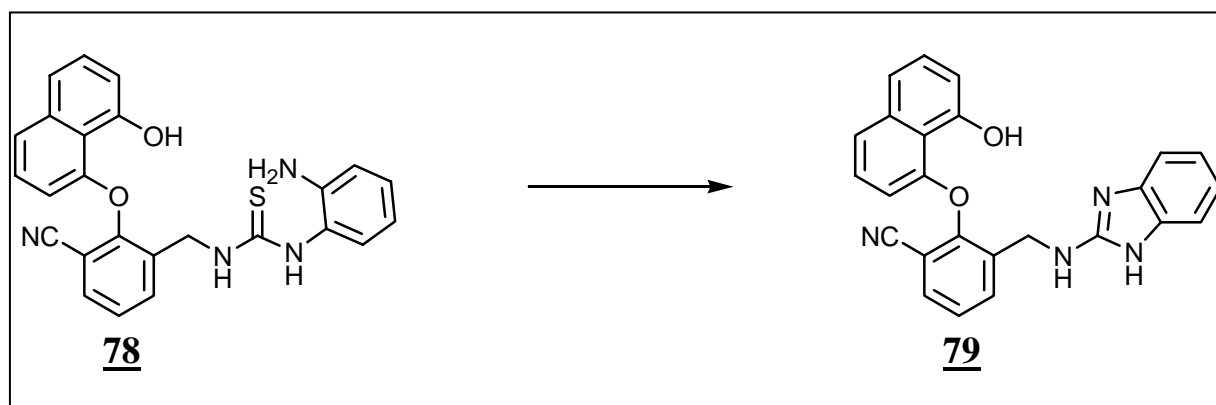
Ber.: C 66.02, H 5.27, N 10.70

Gef.: C 65.83, H 5.30, N 11.01

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250 MHz) 4.20 (m, 2H, benzyl.-CH₂), 4.64 (m, 2H, NH₂), 6.14 (d, 1H, J = 7.0, 8-H), 6.32 (t, 1H, J = 7.1, Benzimidazol-H), 6.54 (d, 1H, J = 7.1, Benzimidazol-H), 6.71-6.77 (m, 3H, 2-H, 2×Benzimidazol-H), 7.03 (t, 1H, J = 7.9, 7-H), 7.03 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.25 (t, J = 7.7, 4'-H), 7.35 (d, 1H, J = 7.6, 6-H), 7.51 (br. s, 1H, benzyl.-NH), 7.51 (d, 1H, J = 7.6, 3'-H), 7.60 (d, 1H, J = 7.4, 5'-H), 8.84 (s, 1H, Thioharnstoff-NH), 9.30 (s, 1H, -OH)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ¹H-¹H COSY ([D₆] DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.12.2 Synthese von 8-[(2'-Benzimidazol-2'-ylamino)-methyl]-6'-cyano-8-hydroxy-naphth-1-ol 79



In einem Zweihalskolben wurden 0.80 g (1.85 mmol) Edukt **78** in 20 ml abs. MeOH gelöst und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden portionsweise über 3 h 0.80 g (3.70 mmol) HgO und 12 mg (0.37 mmol) Schwefel zu der Reaktionslösung zugegeben. Die Lösung wurde über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 50 g Kieselgel (EtOAc/MeOH; 10:1: +1 % NEt₃ → 5:1:+1 % NEt₃) gereinigt. Man erhielt einen leicht braunen Feststoff.

Ausbeute: 0.51 g (69%)

DC: EtOAc/MeOH; 10:1: +1 % NEt₃ R_f = 0.58

Schmp.: 143-145 °C

IR (KBr): 3395 s, 3054 w, 2926 w, 2369 w, 2233 m, 1669 m, 1630 m, 1604 s, 1576 s, 1508 w, 1563 m, 1450 m, 1394 m, 1365 w, 1298 w, 1269 w, 1248 s, 1216 w, 1200 m, 1157 w, 1112 w, 1081 w, 1024 m, 851 w, 817 m, 754 m

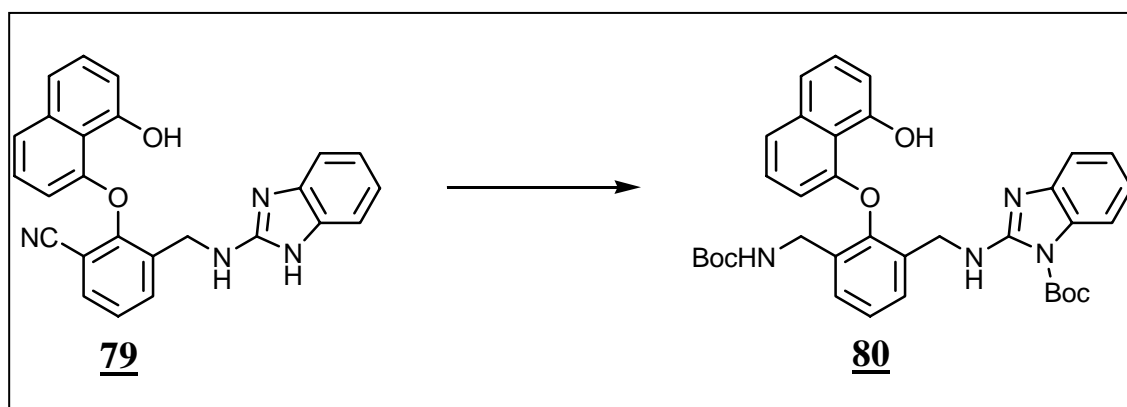
EA: C₂₅H₁₈N₄O₂ (406.14)

Ber.: C 73.88, H 4.46, N 13.78

Gef.: C 73.62, H 4.26, N 13.51

¹H-NMR ([D₆] DMSO, 250 MHz) 4.20 (m, 2H, benzyl.-CH₂), 6.41 (d, 1H, J = 7.6, 8-H), 6.83 (t, 2H, J = 7.2, 2 × Benzimidazol-H), 6.94 (m, 1H, 2-H), 7.07 (d, 2H, J = 7.3, 2 × Benzimidazol-H), 7.28 (t, 1H, J = 7.9, 7-H), 7.38 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.44 (t, J = 7.7, 4'-H), 7.54 (d, 1H, J = 7.5, 6-H), 7.80 (d, 2H, J = 8.0, 3'-H, 5'-H), 9.51 (br. s, 1H, -NH), 10.89 (s, 1H, -OH)

8.2.12.3 Synthese von 8-[2'-(1-*tert*-Butoxycarbonylbenzimidazol-2'-ylamino-methyl)-6'-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1'-phenoxy]-naphth-1-ol 80



In einem einseitig verschlossenen Quarzzylinder wurden 0.2 g Pd/C, 50 mg PtO₂ und 0.21 g BocO₂ (0.98 mmol) vorgelegt und dann 0.2 g (0.49 mmol) Monobenzimidazol **79** gelöst in 20 ml abs. MeOH, zugegeben. Danach wurde der Quarzzylinder in einer Druckapparatur platziert, dreimal mit Argon durchspült, mit H₂ ein Druck von 45 bar eingestellt und bei einer Temperatur von 55 °C für 5 h gerührt. Die Lösung wurde über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und danach mit 20 g Kieselgel (EtOAc/Hex, 1:1 → 2:1) gereinigt. Man erhielt einen fast farblosen Feststoff.

Ausbeute: 60 mg (20 %)

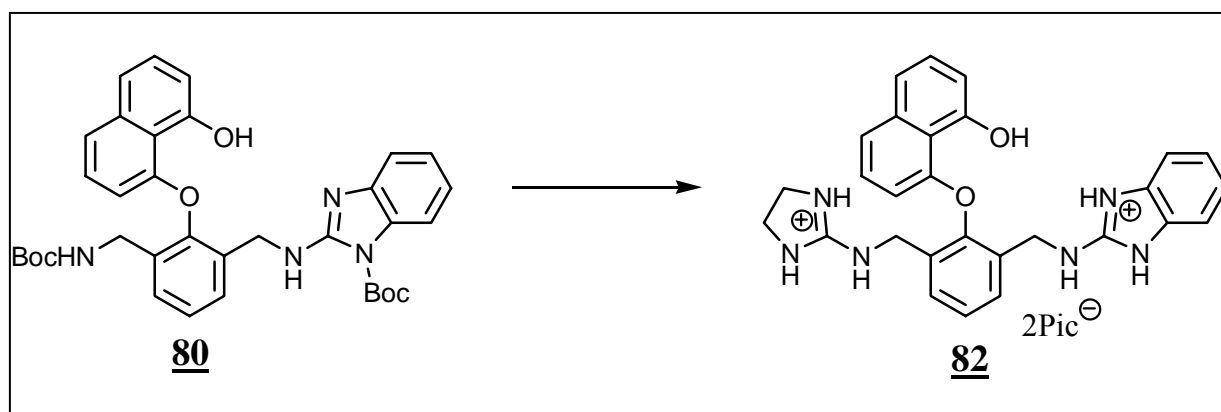
Schmp. 158-160 °C

IR (KBr): 3854 m, 3839 m, 3802 m, 3751 m, 3712 m, 3690 m, 3676 m, 3649 m, 3629 m, 3425 w, 3055 m, 2928 m, 1800 s, 1761 s, 1675 w, 1630 w, 1602 w, 1576 w, 1460 w, 1385 w, 1369 w, 1249 w, 1200 m, 1082 s, 1027 m, 913 s, 850 s, 819 s, 800 s, 743 m, 697 s, 677 s, 651

s

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz) 1.35 (s, 9H, t-Bu Carbamat), 1.65 (s, 9H, t-Bu Carbamat Benzimidazol), 4.03 (m, 2H, benzyl.- CH_2), 4.65 (m, 2H, benzyl.- CH_2 Benzimidazol), 6.32 (d, 1H, $J = 7.0$, 8-H), 6.89 (m, 1H, 2-H), 6.99 (t, 1H, $J = 7.7$, Benzimidazol-H), 7.08 (t, 1H, $J = 6.5$, Benzimidazol-H), 7.19 (m, 5H, 3-H, 4-H, 7-H, $2 \times$ Benzimidazol-H), 7.37 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.46 (m, 3H, 4'-H, 6-H, benzyl.-NH), 7.66 (t, 1H, $J = 6.8$, benzyl.-NH von Benzimidazol), 9.49 (s, 1H, 1-OH)

8.2.12.4 Synthese von 8-{2'-[(1*H*-Benzimidazol-2'-ylamino)-methyl]-6'-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2'-ylamino)-methyl]-phenoxy}-naphth-1-ol, Salz mit Pikrinsäure **82**



In einem Einhalskolben wurden 0.08 g (0.13 mmol) des geschützten Monobenzimidazols **80** in 20 ml CH_2Cl_2 aufgelöst und 1 ml TFA zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde dann in 6 ml $\text{NEt}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1:1) gelöst und 29 mg (0.197 mmol) Dihydroimidazoliumsulfonsäure **17** zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 12 h bei RT gerührt. Dann wurde die Probe in einem Scheidetrichter überführt, 2 ml 2 M NaOH-Lösung zugegeben und zweimal mit 20 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml MeOH gelöst und 66 mg (0.29 mmol) Pikrinsäure, ebenfalls gelöst in 10 ml MeOH, zu der Lösung zugegeben. Zu der

tiefgelben Lösung gab man bis zur beginnenden Kristallisation Wasser hinzu. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und im HV getrocknet.

Ausbeute: 90 mg (74 %)

Schmp.: 141-142 °C

IR (KBr): 3258 m, 3095 m, 1673 s, 1627 m, 1565 m, 1550 m, 1477 w, 1432 w, 1394 w, 1364 m, 1335 s, 1315 s, 1269 s, 1196 w, 1162 m, 1113 w, 1079 m, 1026 m, 911 w, 850 w, 818 m, 745 m, 710 m

EA: $\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ (936.21) \times 0.5 H_2O

Ber.: C 50.42 H 3.98 N 16.80

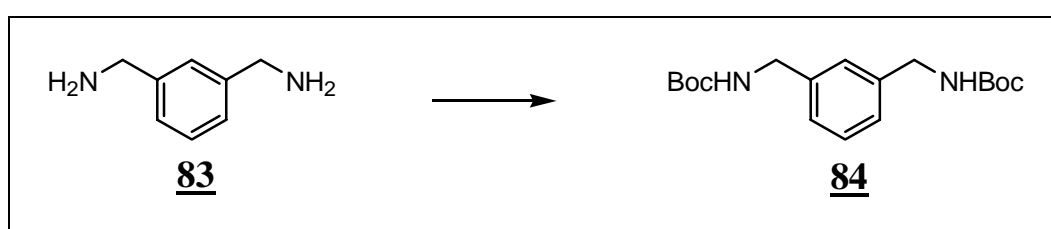
Gef.: C 50.61 H 3.89 N 17.07

^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz) 3.42 (m, 4H, Ethylenbrücken Dihydroimidazol), 4.23 (m, 4H, benzyl.- CH_2), 6.24 (d, 1H, $J = 7.7$, 8-H), 6.83 (m, 1H, 2-H), 7.21 (m, 5H, 7-H, 4 \times Benzimidazol-H), 7.30 (m, 2H, 3-H, 4-H), 7.43 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 6-H), 7.59 (d, 1H, $J = 7.4$, 5'-H), 8.46 (t, 1H, $J = 6.7$, benzyl.-NH von Dihydroimidazol austauschbar mit D_2O), 8.58 (s, 4H, Pikrat), 9.05 (br. s, 1H, benzyl.-NH von Benzimidazol austauschbar mit D_2O), 9.2 (s, 1H, 1-OH austauschbar mit D_2O), 12.48 (br. s, 2H, Benzimidazol-NH austauschbar mit D_2O)

Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe eines ^1H - ^1H COSY ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz) Spektrums.

8.2.13 Synthese von 1,3 Bis-(1*H*-benzimidazol-2-yl-1-aminomethyl)-benzol 88

8.2.13.1 Synthese von [3-(*tert*-Butoxycarbonylamino-methyl)-benzyl]-carbamidsäure-*tert*-butylester 84



In einem Einhalskolben wurden 1 g (7.34 mmol) 3-Aminomethyl-benzylamin 83 in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei RT 4 g (18.35 mmol) Boc_2O gelöst in 10 ml CH_2Cl_2 , langsam zugetropft. Dabei entstand eine farblose Suspension. Nach 4 h bildete sich eine klare Lösung, dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 60 g Kiesegel (EtOAc/Hex; 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.47 g (100 %)

Schmp.: 86-88 °C

DC: EtOAc/Hex; (1:1), $R_f = 0.79$

IR (KBr): 3852 m, 3838 m, 3820 m, 3750 m, 3734 m, 3711 m, 3688 m, 3674 m, 3648 m, 3628 m, 3355 w, 2983 w, 2934 m, 2873 m, 2753 s, 2395 s, 2346 s, 2287 s, 1992 s, 1954 s, 1880 s, 1688 w, 1653 w, 1610 m, 1592 m, 1529 w, 1492 w, 1463 m, 1443 w, 1389 m, 1299 w, 1261 w, 1247 w, 1167 w, 1132 w, 1089 m, 1048 m, 975 w, 941 s, 892 s, 863 m, 739 w, 762 m, 736 s, 702 w, 639 w, 624 w, 537 s, 544 s

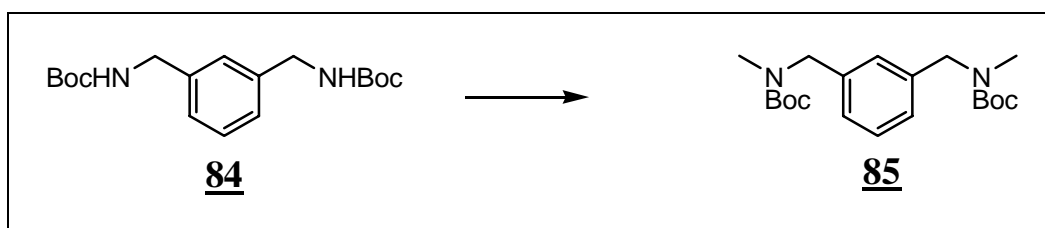
EA: C₁₈H₂₈N₂O₄ (336.20)

Ber.: C 64.26, H 8.39, N 8.33

Gef.: C 64.13, H 8.42, N 8.65

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz): 1.40 (s, 18H, t-Bu Carbamat), 4.10 (d, 4H, J = 6.0, benzyl.-CH₂), 7.08 (m, 3H, 2-H, 4-H, 6H), 7.23 (t, 1H, J = 7.2, 5-H), 7.34 (t, 2H, J = 6.0, benzyl.-NH₂)

8.2.13.2 Synthese von {3-[(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-methyl]-benzyl}-methyl-carbamidsäure-tert-butylester **85**



In einem Dreihalskolben wurden 1 g (2.97 mmol) der Verbindung **84** in 20 ml abs. THF gelöst und auf 3°C abgekühlt. Dann wurden über ein Septum 4.08 ml (6.53 mmol) n-BuLi langsam zugetropft. Anschließend wurden zu der Reaktionslösung 0.4 ml (6.53 mmol) MeI zugetropft. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und für 12 h weiter gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit 60 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:3) gereinigt. Man erhielt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 1.07 g (99 %)

DC: EtOAc/Hex; (1:1), R_f = 0.79

IR (KBr): 2425 m, 2338 m, 2294 m, 1704 m, 1610 m, 1592 m, 1538 m, 1481 w, 1463 w, 1451 w, 1398 w, 1364 w, 1270 w, 1240 w, 1172 w, 1048 m, 1032 m, 1003 s, 973 m, 918 m,

837 w, 844 s, 811 s, 768 w, 744 m, 725 s, 711 m, 694 m, 682 s, 662 s, 650 s, 638 s, 618 s, 606 s, 588 s

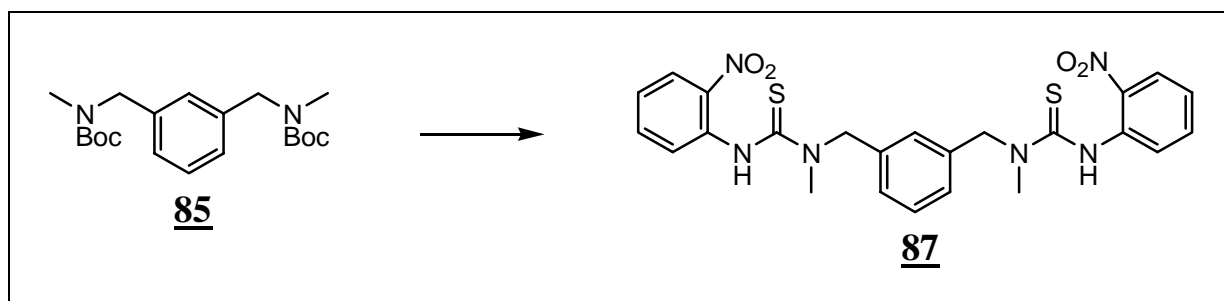
EA: C₂₀H₃₂N₂O₄ (364.24)

Ber.: C 65.91, H 8.85, N 7.69

Gef.: C 65.54, H 9.14, N 7.44

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250MHz): 1.40 (s, 18H, t-Bu Carbamat), 2.76 (s, 6H, N-CH₃), 4.37 (s, 4H, benzyl.-CH₂), 7.06 (m, 3H, 2-H, 4-H, 6H), 7.31 (t, 1H, J = 7.5, 5-H)

8.2.13.3 Synthese von Bis-[N-(2-Nitro-phenyl)-thioureidomethyl]-benzol 87



In einem Einhalskolben wurden 1 g (2.74 mmol) der N-methylierten Verbindung **85** in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, 2 ml TFA zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im HV getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml abs. MeOH gelöst und 0.5 ml NEt₃ zugegeben. In einem anderen Kolben wurden 1.23 g (6.85 mmol) Nitrophenylisothiocyanat in 20 ml abs. MeOH gelöst und auf 3 ° C abgekühlt. Dann wurden zu der Reaktionslösung 10 ml der nun mehr entschützten Verbindung **71** zugetropft, danach die Reaktionslösung auf RT erwärmt und bei RT für 2 h weitergerührt. Mit der Zeit fiel ein gelber Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und in HV getrocknet.

Ausbeute: 0.7 g (49 %)

Schmp.: 160 °C

DC: EtOAc/Hex; (1:1), $R_f = 0.4$

IR (KBr): 3853 m, 3840 m, 3675 m, 3451 m, 3155 m, 3107 m, 3044 m, 3004 m, 2948 m, 2920 m, 2343 s, 1974 s, 1942 s, 1830 s, 1734 s, 1718 s, 1684 s, 1653 s, 1609 m, 1586 m, 1539 w, 1522 w, 1489 w, 1448 m, 1435 m, 1420 m, 1388 m, 1353 w, 1344 w, 1330 w, 1267 m, 1222 w, 1165 s, 1145 s, 1099 m, 1043 s, 999 s, 960 s, 941 s, 920 s, 873 s, 860 s, 832 s, 778 m, 758 s, 745 s, 722 m, 701 s, 687 s, 650 s, 625 s, 565 s

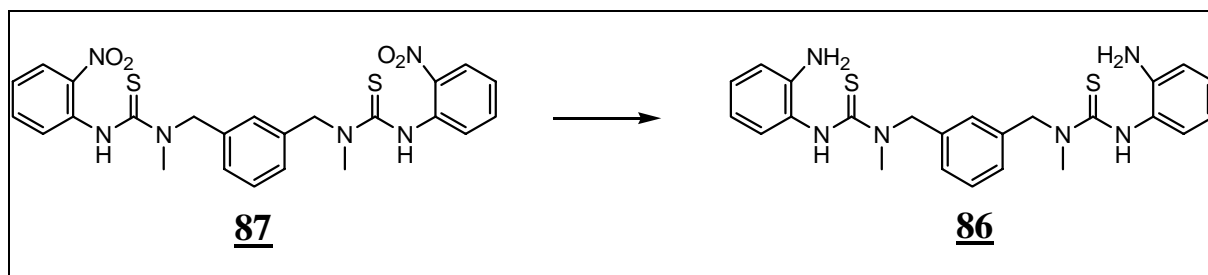
EA: $C_{24}H_{24}N_6O_4S_2$ (524.13) \times 1 MeOH

Ber.: C 53.94, H 5.07, N 15.10

Gef.: C 53.94, H 4.51, N 14.81

$^1\text{H-NMR}$: ($[D_6]$ DMSO, 250MHz): 3.23 (s, 6H, N-CH₃), 5.17 (s, 4H, benzyl.-CH₂), 7.25 (m, 3H, 2-H, 4-H, 5-H), 7.38 (m, 5H, 5-H, 4 \times Nitrophenyl-H), 7.67 (t, 2H, $J = 7.7$, 2 \times Nitrophenyl-H), 8.02 (d, 2H, $J = 8.2$, 2 \times Nitrophenyl-H), 9.56 (s, 2H, NH)

8.2.13.4 Synthese von Bis-[N-(2-amino-phenyl)-thioureidomethyl]-benzol **86**



In einem einseitig verschlossenen Quarzzylinder wurden 50 mg Pd/C vorgelegt und dann 0.5 g (0.95 mmol) Bis(nitrophenyl)-thioharnstoff **87** gelöst in 20 ml CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (1:1:1%), zugegeben. Danach wurde der Quarzzylinder in einer Druckapparatur platziert, dreimal mit Argon durchspült, mit H₂ ein Druck von 45 bar eingestellt, verschlossen und bei 40 °C für 16 h gerührt. Dann wurde die Druckapparatur mit Argon gespült und entlüftet, die Lösung über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff mit 40 g Kieselgel (EtOAc/MeOH/NH₃, 1:1:1%) gereinigt.

Ausbeute: 0.1 g (23 %)

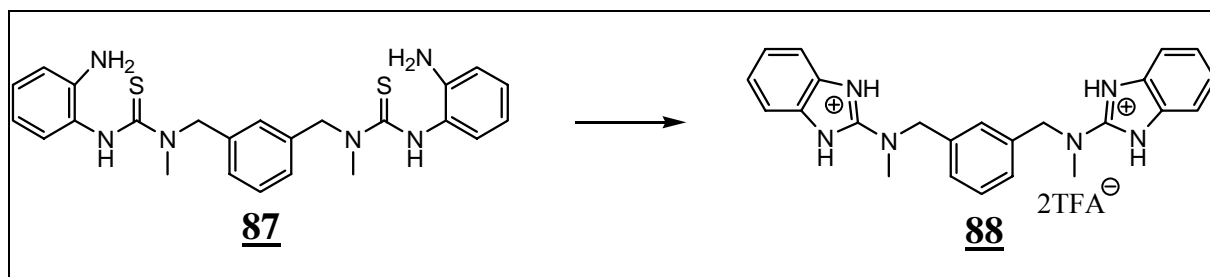
Schmp.: 56-58 °C

DC: EtOAc/MeOH/NH₃;(1:1:1%), R_f = 0.68

IR (KBr): 3851 m, 3835 m, 3733 m, 3646 m, 3626 m, 3443 m, 2924 m, 1607 s, 1586 s, 1505 m, 1446 s, 1383 s, 1338 m, 1269 s, 1219 s, 1162 s, 1088 s, 1039 s, 991 s, 865 s, 832 s, 779 s, 730 s, 701 s, 643 s, 606 s, 586 s, 553 s

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250MHz): 3.17 (s, 6H, N-CH₃), 3.66 (s, 4H, NH₂), 5.12 (s, 4H, benzyl.-CH₂), 7.16 (m, 6H, 2-H, 4-H, 5-H, 6-H, 2 × Nitrophenyl-H), 7.47 (d, 2H, J = 8.2, 2 × Nitrophenyl-H), 7.62 (t, 2H, J = 8.5, 2 × Nitrophenyl-H), 7.96 (d, 2H, J = 8.2, 2 × Nitrophenyl-H), 9.20 (s, 2H, NH)

8.2.13.5 Synthese von 1,3 Bis-(1*H*-benzimidazol-2-yl-1-aminomethyl)-benzol 88



In einem Zweihalskolben wurden 0.10 g (0.21 mmol) Bis(aminophenyl)-thioharnstoff 88 in 20 ml abs. MeOH gelöst und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden portionsweise über 3 h 0.80 g (3.70 mmol) HgO und 12 mg (0.37 mmol) Schwefel zu der Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wurde über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit reversed phase HPLC gereinigt. Man erhielt einen fast farblosen Feststoff.

HPLC: Analytisch: Maisch Reprosil-Pur RP C18-AQ (10 μ , 250 \times 20 mm), Gradient:

H₂O/MeCN 75:25 + 1 % TFA, Detektion: 275 nm,

Semipräp.: Merck Lichrosorb Select B, H₂O/MeCN 75:25 + 1 % TFA

Retentionszeit: 6.02 min.

Ausbeute: 40 mg (30 %)

Schmp.: 90°C

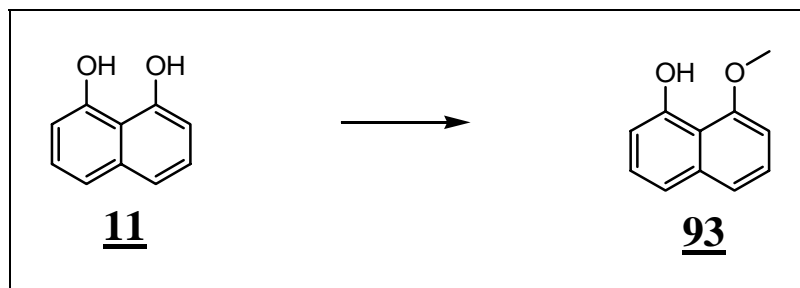
IR (KBr): 3865 w, 3832 m, 3720 m, 3636 w, 3630 m, 3440 m, 2910 m, 1610 m, 1580 s, 1500 m, 1440 s, 1389 m, 1340 m, 1263 s, 1211 s, 1160 m, 1090 s, 1030 m, 990 s, 855 s, 830 m, 760 m, 720 m, 700 m, 640 s, 601 s, 581 s

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz): 3.42 (s, 6H, N-CH₃), 5.14 (s, 4H, benzyl.-CH₂), 7.36 (m, 4H, 2-H, 4-H, 6-H, 1 \times Nitrophenyl-H), 7.67 (m, 8H, 5-H, 7 \times Nitrophenyl-H)

MS (ESI⁺): 397.2 (397.21 berechnet für C₂₄H₂₅N₆⁺)

8.2.14 Synthese von 2-Dimethylaminomethyl-8-methoxy-naphth-1-ol 96

8.2.14.1 Synthese von 8-Methoxy-naphth-1-ol 93



In einem Zweihalskolben wurden 0.25 g (6.24 mmol) NaH auf (60 %ige Suspension in Mineralöl) in 2 ml abs. DMF suspendiert und im Argongegenstrom 1 g (0.64 mmol) Diol 11 gelöst in 8 ml abs. DMF, langsam zugegeben. Dann wurde die Suspension zum Rückfluss erhitzt. Nach 10 min entstand eine grüne Lösung, die dann auf Raumtemperatur abgekühlt wurde und anschließend im Argongegenstrom 0.38 ml (6.24 mmol) Methyljodid zugegeben wurden. Daraufhin wurde die Lösung wieder 10 min zum Sieden erhitzt. Dann wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, auf HCl saures Eiswasser gegossen und in einem Scheidetrichter zweimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und dann mit 40 g Kieselgel (EtOAc/Hex; 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 0.76 g (71 %)

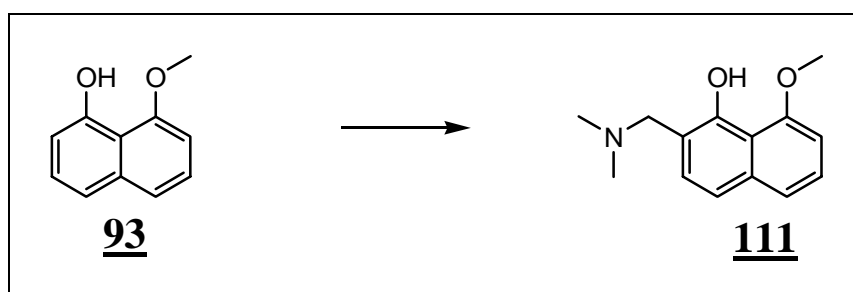
DC: EtOAc/Hex; (1:3), R_f = 0.46

Schmp.: 54 °C

IR (KBr): 3851 m, 3748 m, 3742 m, 3733 m, 3686 m, 3673 m, 3646 m, 3624 m, 3564 m, 3355 w, 3093 m, 3057 m, 3024 m, 3012 m, 2976 m, 2948 m, 2842 m, 2343 s, 2032 s, 1915 s, 1836 s, 1739 s, 1711 s, 1629 w, 1612 w, 1582 w, 1513 m, 1450 w, 1403 w, 1368 m, 1306 m, 1261 w, 1227 w, 1197 w, 1178 m, 1158 m, 1119 w, 1076 w, 1027 m, 963 w, 876 s, 860 s, 812 w, 779 s, 753 w, 673 w, 637 m

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 250 MHz: 4.03 (s, 3H, O-Me); 6.75 (d, 1H, $J = 8.3$, 7-H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.4$, 1-H), 7.30 (m, 4H, 2-H, 4-H, 5-H, 6-H), 10.10 (s, 1H, -OH)

8.2.14.2 Synthese von 2-Dimethylaminomethyl-8-methoxy-naphth-1-ol **111**



In einem Dreihalskolben wurden 0.15 g (0.86 mmol) Methoxy-naphthol **93** unter Argonatmosphäre in 12 ml abs. MeOH gelöst. Dann wurde die Reaktionslösung auf 60 °C erwärmt und 0.24 g (2.6 mmol) N,N-Dimethylmethyleniminiumchlorid suspendiert in 4 ml abs. MeOH, tropfenweise zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand im HV getrocknet und mit dann 10 g Kieselgel (MeOH/ CH_2Cl_2 ; (1:1 +1% NEt_3) gereinigt. Man erhielt einen fast farblosen Feststoff.

Ausbeute: 0.16 g (80 %)

DC: MeOH/CH₂Cl₂/NH₃; (1:1:1%), R_F = 0.64

Schmp.: 115-116°C

IR (KBr): 3690 m, 3676 m, 3630 m, 3385 m, 2924 m, 2853 m, 2326 s, 2279 s, 1734 s, 1675 m, 1635 m, 1605 m, 1564 m, 1541 m, 1482 m, 1458 m, 1432 s, 1364 m, 1344 m, 1315 m, 1265 m, 1195 m, 1162 s, 1118 s, 1091 m, 1038 s, 928 s, 909 s, 874 s, 833 s, 822 s, 789 s, 743 s, 710 s, 663 s

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 250 MHz): 2.73 (s, 6H, N-(CH₃)₂), 4.08 (s, 3H, O-Me); 4.35 (s, 2H, N-CH₂), 7.04 (d, 1H, J = 8.7, 8-H), 7.39 (t, 1H, J = 8.5, 7-H), 7.49 (s, 1H, 3-H), 7.60 (d, 1H, J = 8.2, 6-H) 10.7 (br. s, 1H, -OH)

MS (ESI⁺): 232.0 (232.13 berechnet für C₁₄H₁₈NO₂⁺)

8.3 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeiten

Alle Reaktionsgeschwindigkeiten in der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der reversed phase HPLC bestimmt. Dabei ging man immer nach dem gleichen Muster vor. Zunächst wurden die gewünschten Mengen der Reaktanden auf einer Analysenwaage in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eingewogen und mit dem nötigen Volumen an Lösungsmittel mit oder ohne Base aufgefüllt. Dann wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß in einem auf 30°C temperierten Thermostaten aufbewahrt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 10 µl des Reaktionsgemisch entweder in 90 µl einer Mischung aus MeOH/(H₂O + 1% TFA) gegeben oder in CH₃CN/(H₂O + 1 %TFA) und dann mit der reversed phase HPLC untersucht. Sämtliche Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 275 nm. Bei der Säule handelte es sich um Merck RP-18 endcapped (5µm). Die Flussrate betrug 0.8ml/min. Alle Messungen in dieser Arbeit wurden jeweils mit einem der beiden folgenden Gradienten gemessen:

Tabelle 16: Gradienten zu Untersuchungen mit der reversed phase HPLC.

Zeit (min)	Vol.H ₂ O + 1% TFA	Vol. MeOH
0	85	15
7	75	25
12	60	40
16	45	55
19	30	70
25	30	70
30	85	15
40	85	15

Zeit (min)	Vol.H ₂ O + 1% TFA	Vol. CH ₃ CN
0	99	1
7	75	25
12	60	40
16	45	55
19	30	70
25	30	70
30	85	15
40	85	15

Die Eichfaktoren wurden nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Eichfaktor} = \frac{\text{Peakfläche[Standard]}}{\text{Peakfläche[Produkt]}} \times \frac{c[\text{Produkt}]}{c[\text{Standard}]}$$

Durch diese Methode wurden Elutionsprofilen erhalten, deren Peaks man den einzelnen Verbindungen zuordnen konnte. Die Peakflächen ließen sich mit Hilfe der Eichfaktoren und folgender Formel in die Konzentrationen der entsprechenden Verbindungen zu verschiedenen Zeitpunkten umrechnen:

$$c_t[\text{Produkt}] = \frac{\text{Peakfläche[Produkt]}}{\text{Peakfläche[Standard]}} \times c_0[\text{Standard}] \times \text{Eichfaktor[Produkt]}$$

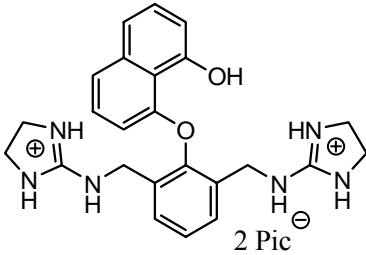
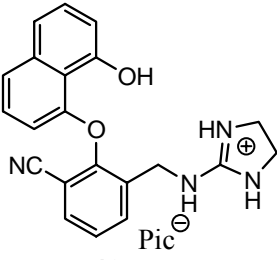
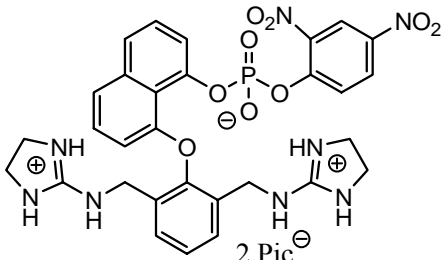
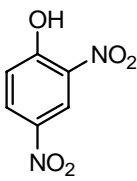
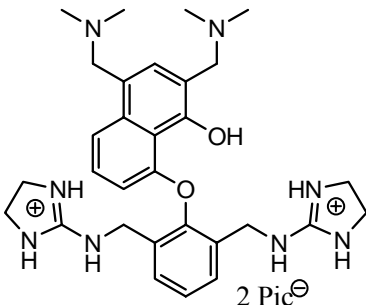
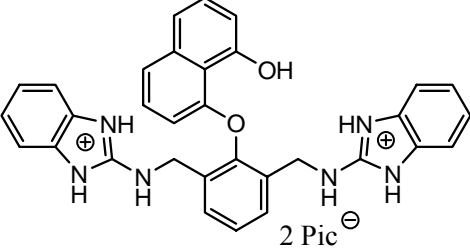
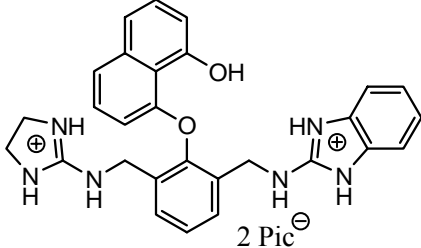
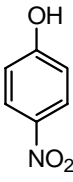
Die Umesterungsprodukte wurden zusätzlich mit Hilfe des ESI⁺ und ³¹P-NMR analysiert. Dabei ging man folgendermaßen vor:

In einem Polyethylengefäß wurden 0.7 ml [D₇] DMF und 1.4 ml frisch destilliertes, wasserfreies DMF zusammengetan (Verhältnis: 1:2). Davon wurde dann eine 250 mM

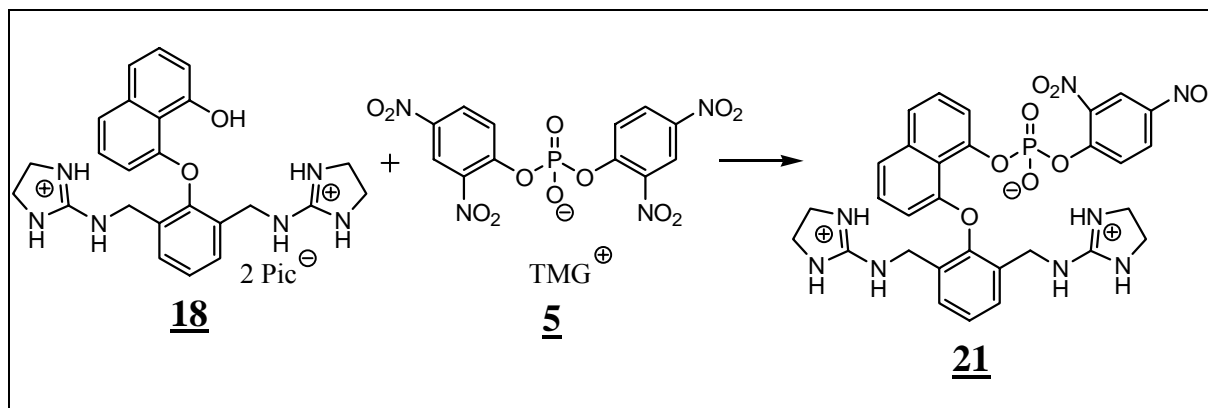
Lösung an Diisopropylethylamin hergestellt. Dann wurde die Probe gut geschüttelt, davon 700 μl entnommen und in einem anderen Polyethylengefäß hinein getan. In diesem Polyethylengefäß wurden dann etwa 3 mg Katalysator, 6 mg Substrat (4,2-BDNPP **5**, 4-BNPP **9** oder 4-MNPP **101**) und 2 mg 1-Nitronaphthalin **92** zusammengegeben. Dann wurde die Probe in ein NMR-Röhrchen überführt und bei 30°C gelagert. Nach entsprechenden Reaktionszeiten wurden die Proben an Hand ^{31}P -NMR und ESI^+ analysiert.

Einige wichtige Umersterungsprodukte wurden in größeren Maßstab synthetisiert und dann mittels ^1H -NMR, ^{31}P NMR und ESI^+ analysiert.

Tabelle 17: Ermittelte Eichfaktoren mit 4-Nitronaphthalin kalibriert **90**.

kationische Naphthole	Eich-faktor	kationische Naphthole	Eich-faktor
 <p style="text-align: center;"><u>18</u></p>	0.74	 <p style="text-align: center;"><u>40</u></p>	0.53
 <p style="text-align: center;"><u>21</u></p>	0.41	 <p style="text-align: center;"><u>95</u></p>	0.17
 <p style="text-align: center;"><u>34</u></p>	1.22	 <p style="text-align: center;"><u>77</u></p>	0.1
 <p style="text-align: center;"><u>81</u></p>	0.22	 <p style="text-align: center;"><u>96</u></p>	0.55

8.3.1 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 18 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin



8.3.1.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser

8.3.1.1.1 Reaktion in DMF/Base

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol 18: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

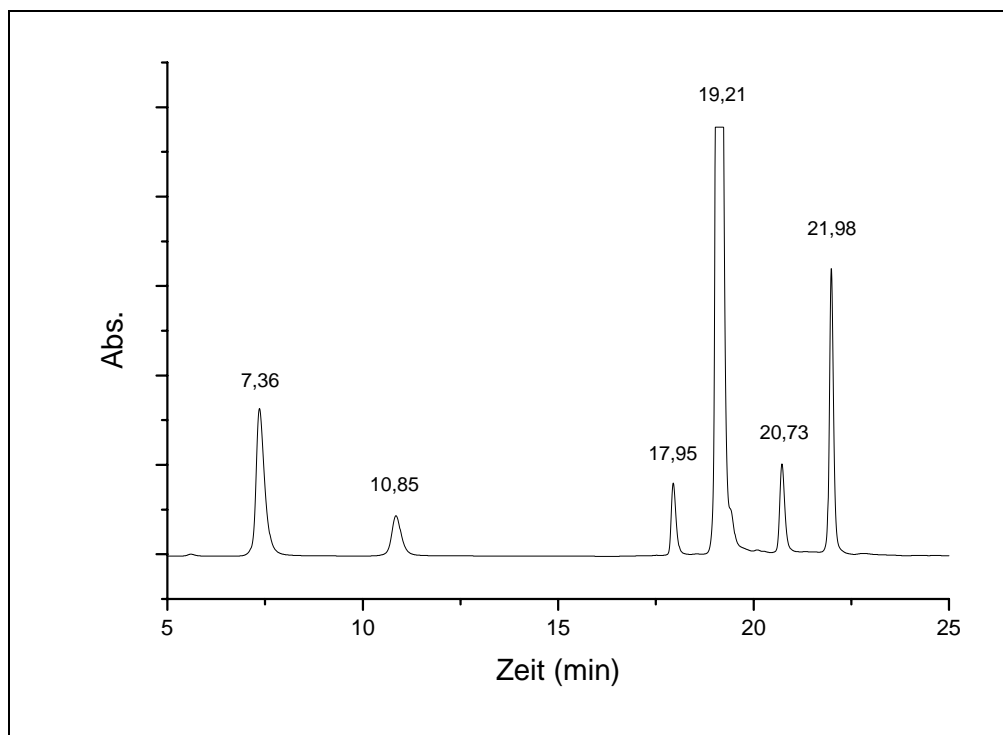


Abb. 38: Elutionsprofil der Reaktion nach 5 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

7.36 min: Pikrinsäure

10.85 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

17.95 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

19.21 min: 2,4-BDNPP **5**

20.73 min: O-Phosphat **21** [$^1\text{H-NMR}$: ([D]DMSO, 400 MHz), $\text{MS}(\text{ESI}^+)$: 677.3 (677.19 berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_9\text{P}^+$) und $^{31}\text{P NMR}$: ([D]DMSO, 400 MHz); -11.40]

21.98 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie Abbildung 38 zeigt, entsteht bei der Reaktion nur eine Verbindung (20.73 min). Um zu beweisen, dass es sich dabei um das gewünschte O-Phosphat **21** handelt, wurde die Reaktion in einem größeren Maßstab durchgeführt, das gewünschte O-Phosphat **21** (siehe 8.2.2) sauber isoliert und schließlich mittels $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz) und $\text{MS}(\text{ESI}^+)$ identifiziert.

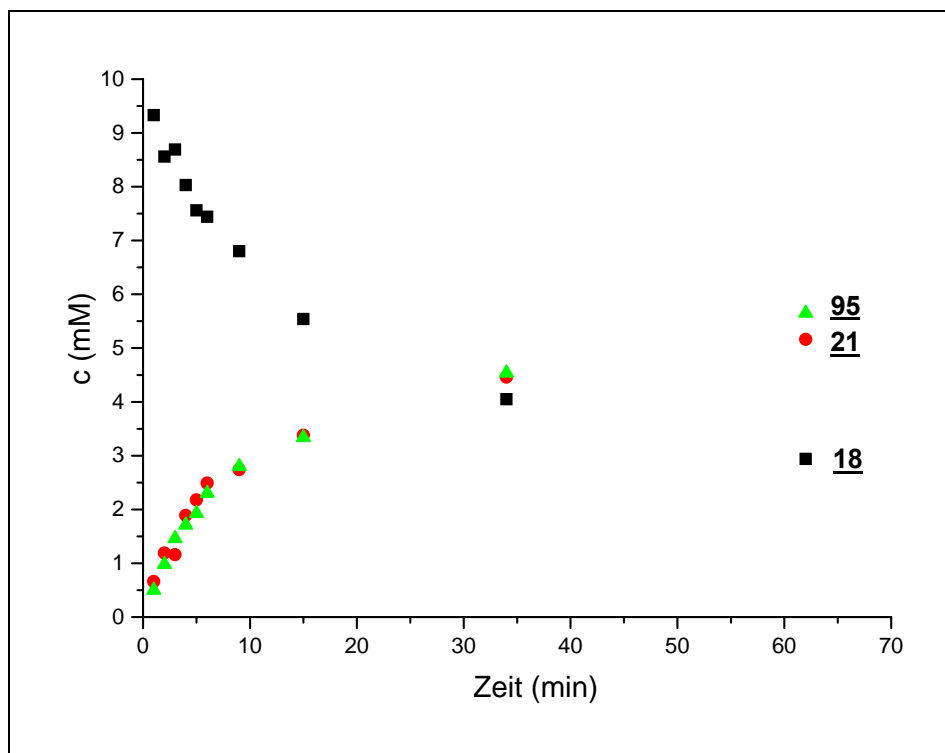


Abb. 39: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-Dinitrophenol **95** und O-Phosphat **21** mit der Zeit.

Abbildung 39 zeigt die gute Korrelation zwischen der Abnahme der Bis(guanidinium)naphthol **18**, der Zunahme des 2,4-Dinitrophenols **95** und der Zunahme des O-Phosphats **21**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer linearen Regression ermittelt:

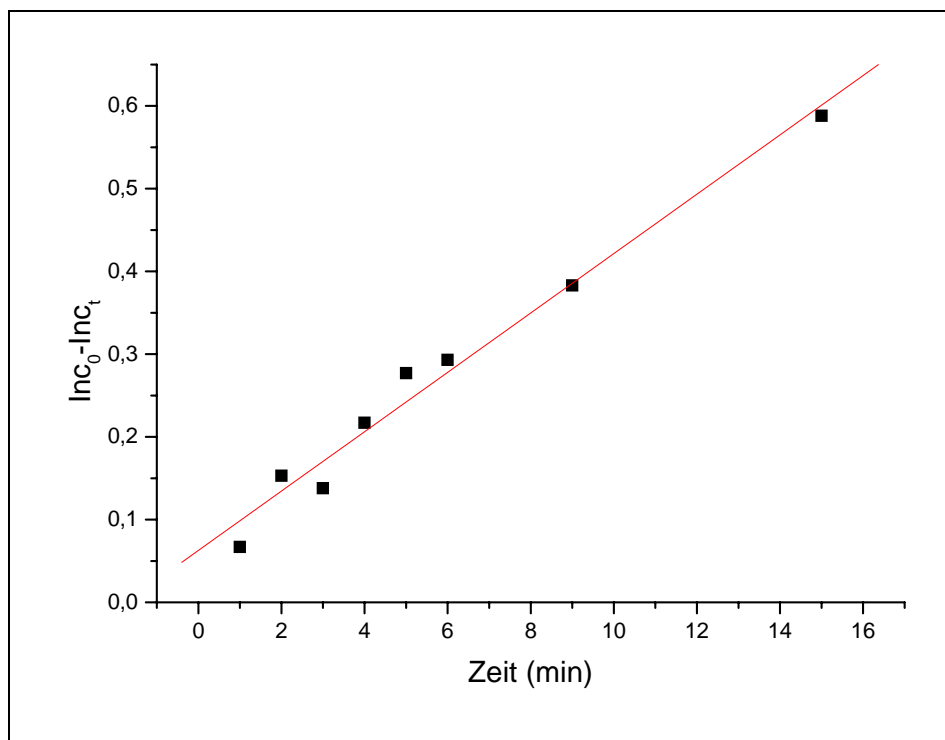


Abb. 40: Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit aus der Konzentrationsabnahme 18.

Die Abbildung 40 zeigt für die ersten 16 min einen deutlich linearen Zusammenhang. Damit handelte es sich bezüglich der Konzentrationabnahme vom Bis(guanidinium)naphthol 18 um eine Reaktion erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 3.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

8.3.1.2 Reaktion in Anwesenheit von Wasser

8.3.1.2.1 Reaktion in DMF/Wasser/Base

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol 18: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Triethylamin: 250 mM, abs. DMF/Wasser (2:1, pH = 11.7), 30°C. Gemessen mit Gradient A.

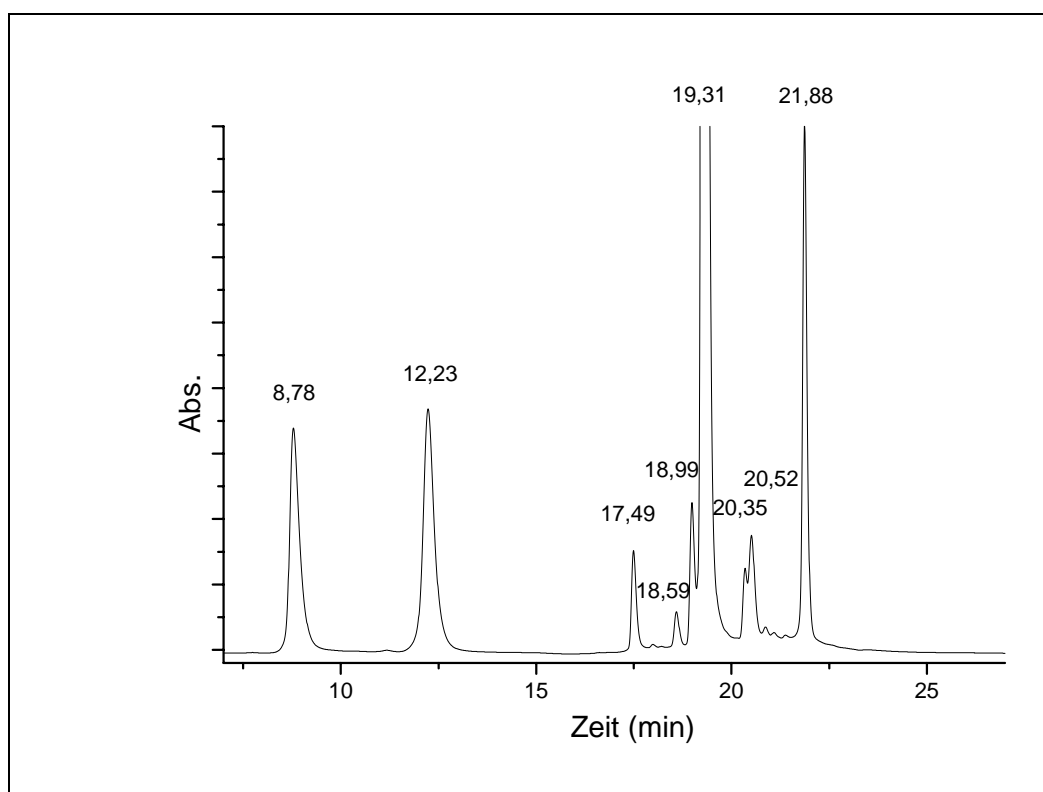


Abb. 41: Elutionsprofil nach 236 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

8.78 min : Pikrinsäure

12.23 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

17.49 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

18.59 min: Unbekannt

18.99 min: freies Phosphat **22** [MS(ESI⁺): 511.12 (511.19 berechnet für C₂₄H₂₈N₆O₅P⁺) und ³¹P-NMR: ([D]DMSO, 400 MHz): 6.86 ppm]

19.31 min: 2,4-BDNPP **5**

20.35 min: O-Phosphat **21** [¹H-NMR: ([D]DMSO, 400 MHz), MS(ESI⁺): 677.3 (677.19 berechnet für C₃₀H₃₀N₈O₉P⁺) und ³¹P-NMR ([D]DMSO, 400 MHz): -11.40 ppm]

20.52 min: Unbekannt

21.88 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie Abbildung 41 zeigt, gibt es in Anwesenheit von Wasser keine saubere Umsetzung zum gewünschten O-Phosphat **21**. Es entstehen zusätzliche Verbindungen, wobei es sich bei dem Peak nach 18.99 min um das freie Phosphat **22** handelt (siehe 8.3.1.2.2).

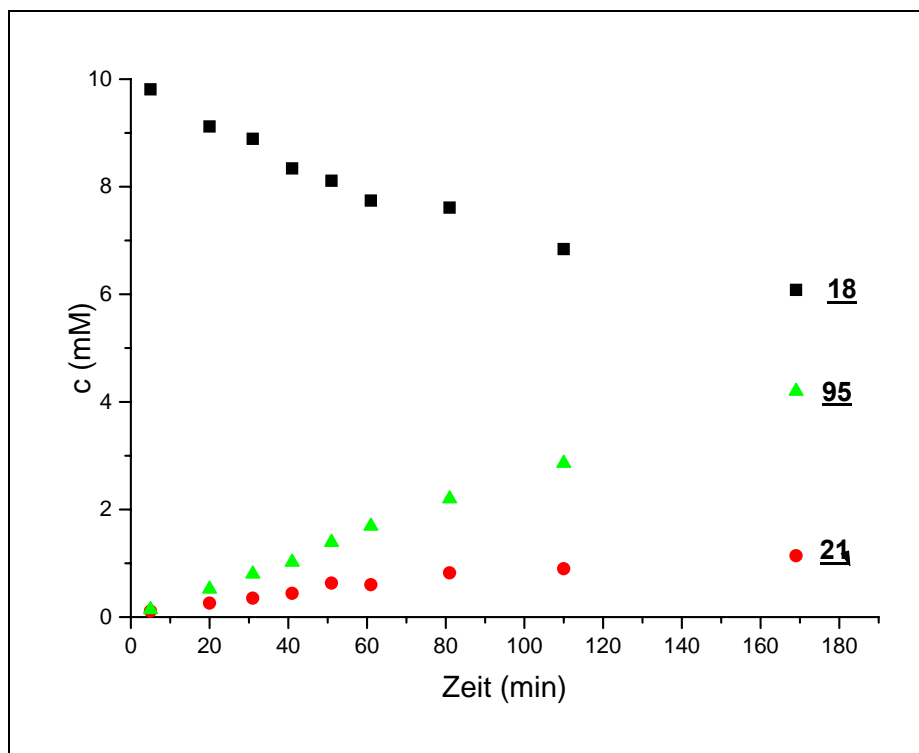


Abb. 42: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol 16, 2,4-Dinitrophenol 95 und O-Phosphat 21 mit der Zeit.

Die Abbildung 42 zeigt deutlich, daß sich das O-Phosphat 21 mit der Zeit zersetzt. Denn die Konzentration vom 2,4-Dinitrophenol 95 nimmt zu und die Konzentration vom O-Phosphat 21 bleibt nach etwa 80 min konstant. Die Konzentration vom Bis(guanidinium)naphthol 18 nimmt zwar ab, bleibt aber nach etwa 180 min auf 6 mM stehen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Beobachtung von 8.3.1.2.2. Denn das O-Phosphat 21 setzt sich mit der Zeit zum freien Phosphat 22 und Bis(guanidinium)naphthol 18 um. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Abnahme des Bis(guanidinium)naphthols 18 wird durch lineare Regression ermittelt:

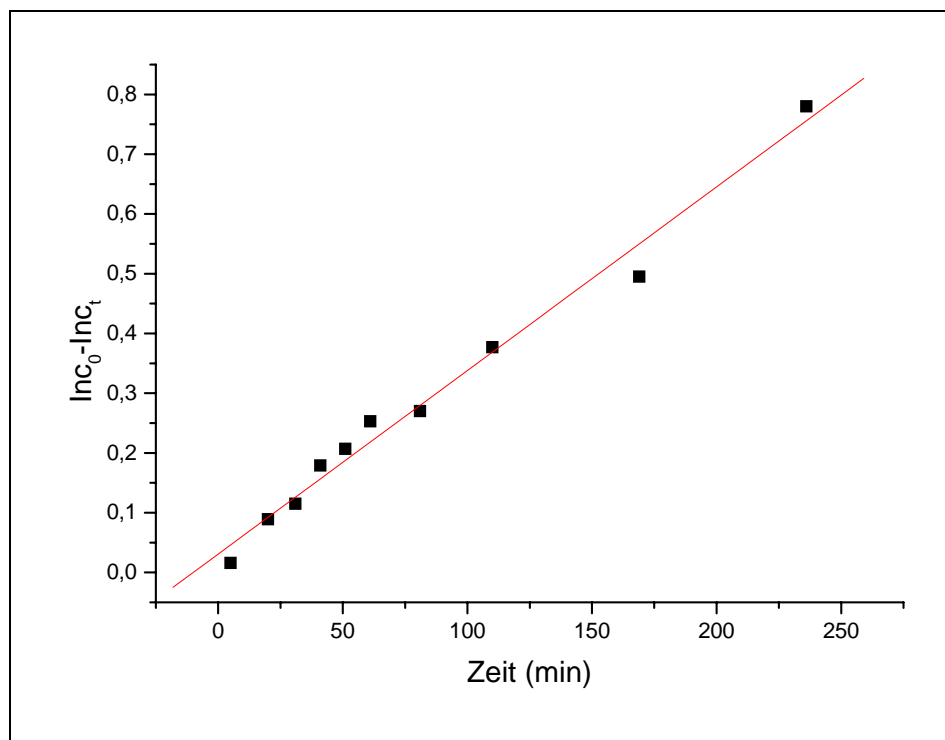


Abb. 43: Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit aus der Konzentrationsabnahme 18.

Aus der Abbildung 43 wurde auch in Anwesenheit von Wasser für die Anfangsphase (230 min) ein linearer Zusammenhang abgeleitet. Damit handelte es sich um eine Reaktion erster Ordnung bezüglich Bis(guanidinium)naphthol 18 mit der Konstanten

$$k_{\text{obs}} = 3.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.1.2.2 Stabilität von O-Phosphat 21 in DMF/Wasser/Base

Reaktionsbedingung: O-Phosphat 21, als Salz der Pikrinsäure: 10 mM, abs. Triethylamin: 250 mM, abs. DMF/Wasser (2:1), 30°C. Gemessen mit Gradient B.

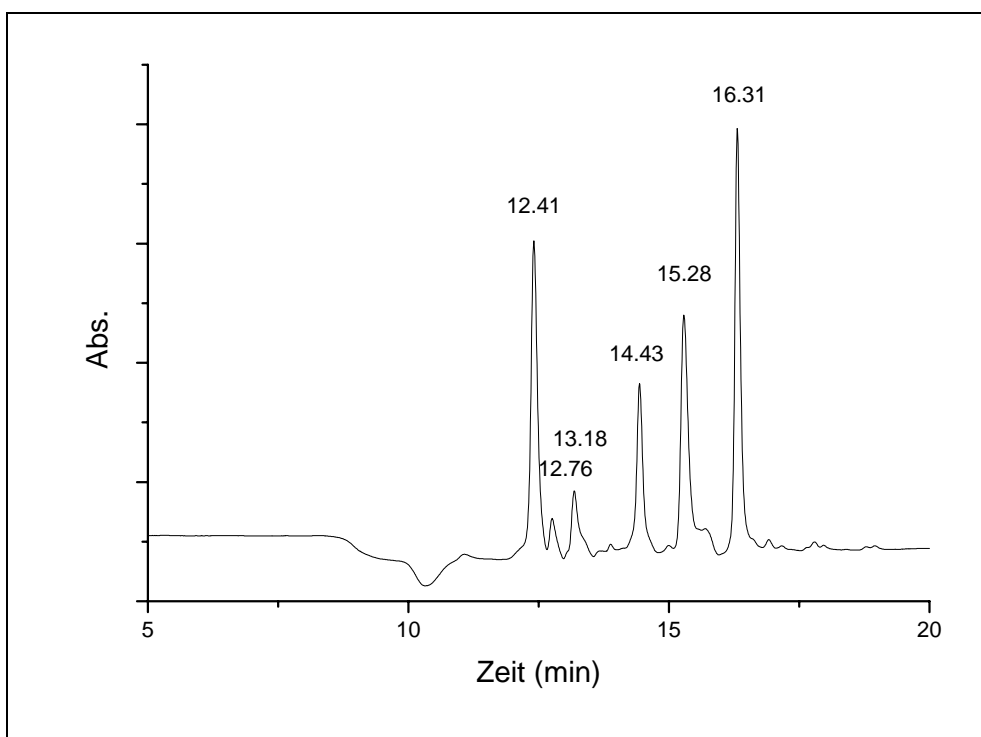


Abb 44. Eluationsprofil nach 210 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

12.41 min: Pikrinsäure

12.76 min: Unbekannt!

13.18 min: Bis(guanidinium)naphthol 18

14.43 min: freies Phosphat 22 [MS(ESI⁺): 511.12 (511.19 berechnet für C₂₄H₂₈N₆O₅P⁺)]

15.28 min 2,4-Dinitrophenol 95

16.31 min: O-Phosphat 21 [MS(ESI⁺): 677.3 (677.19 berechnet für C₃₀H₃₀N₈O₉P⁺)]

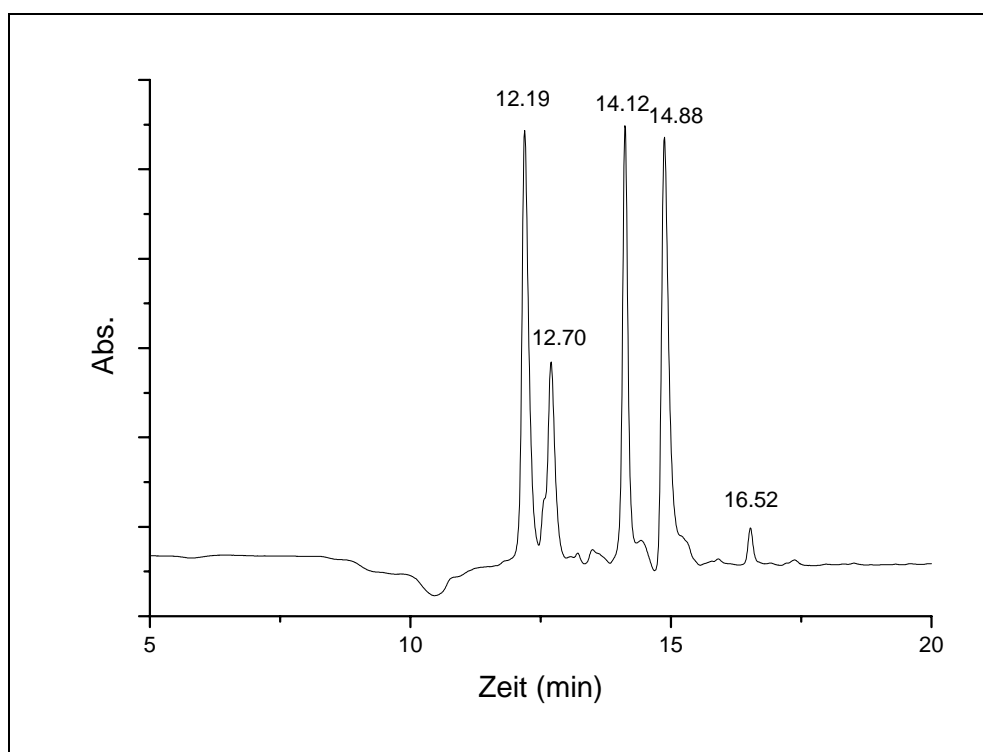


Abb 45: Eluationsprofil nach 6960 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

12.19 min: Pikrinsäure

12.70 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

14.12 min: freies Phosphat **22**

14.88 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

16.52 min: O-Phosphat **21**

Wie die Abbildungen 44 und 45 zeigen, entstehen beim Stabilitätstest drei Verbindungen. Um zu beweisen, daß es sich beim Peak = 12.70 min (Abb. 44) um das Bis(guanidinium)naphthol **18** und Peak = 14.88 min (Abb. 44) um das 2,4-Dinitrophenol **95** handelt, wurden sie alleine mit reversed phased HPLC (Gradient B) gemessen. Die Retentionszeiten waren mit denen in den Abbildungen 44 und 45 vergleichbar. Außerdem wurde am Ende des Stabilitätstests von der Reaktionslösung eine ESI⁺-Spektrum aufgenommen. Dabei waren Signale für das Bis(guanidinium)naphthol **18**, das 2,4-Dinitrophenol **95** und das freie Phosphat **22** zusehen. Daraus kann man noch ableiten, daß es sich beim Peak = 16.52 min (Abb. 45) um das freie Phosphat **21** handelt.

Wie die Abbildungen 44 und 45 weiter zeigen, entstehen das freie Phosphat **22** und das Bis(guanidinium)naphthol **18** parallel. Dabei bleibt das Verhältnis der Produkte **21** und **18** mit

etwa 1:3 während der ganzen Zeit konstant. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Beobachtung vom Experiment 8.3.1.2.1. Dort reagiert bei RT das O-Phosphat **21** mit der Zeit zum freien Phosphat **22** und Bis(guanidinium)naphthol **18**. Deswegen bleibt die Konzentration von O-Phosphat **21** nach etwa 80 min konstant, während die Konzentration von 2,4-Dinitrophenol **95** weiter zunimmt.

8.3.1.2.3 Reaktion in DMF/Puffer

8.3.1.2.3.1 Reaktion in DMF/Trispuffer (2:1) pH 9.9

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol **18**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 9.9, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

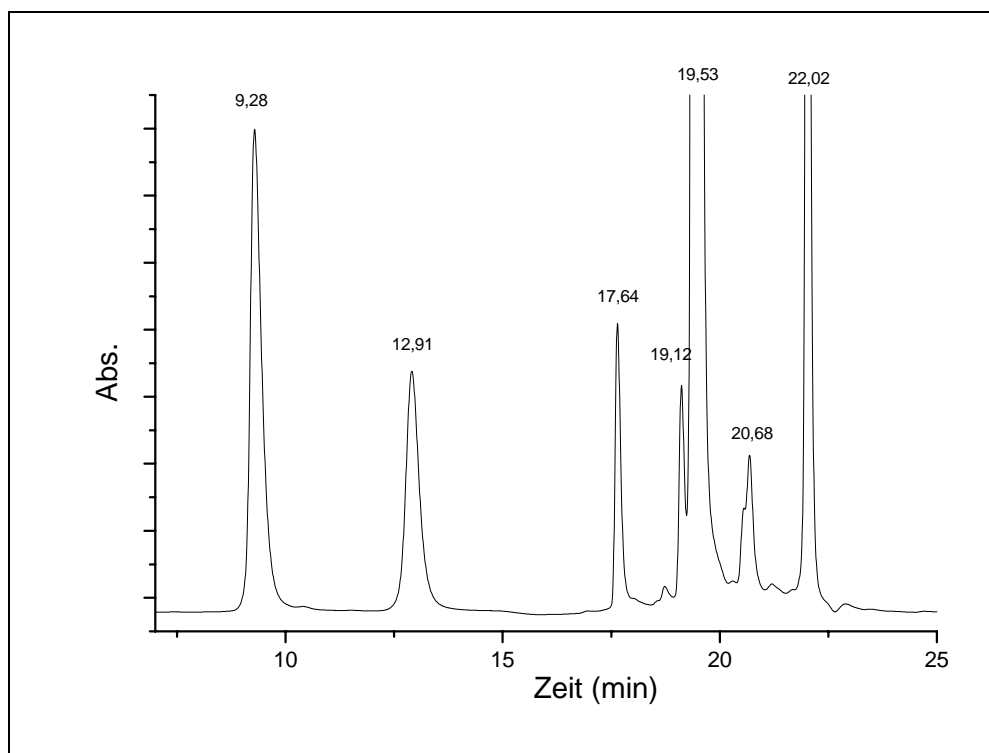


Abb. 46: Eluationsprofil nach 386 min.

Zuordnung zu den Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

9.28 min : Pikrinsäure

12.91 min: 2,4-Dinitrophenol 95

17.64 min: Bis(guanidinium)naphthol 18

19.12 min: freies Phosphat 22

19.53 min: 2,4-BDNPP 5

20.68 min: O-Phosphat 21

22.02 min: 1-Nitronaphthalin 92

Wie nach dem Stabilitätsversuch des O-Phosphates 21 zu erwarten war, sind neben dem O-Phosphat 21 auch andere Verbindungen entstanden.

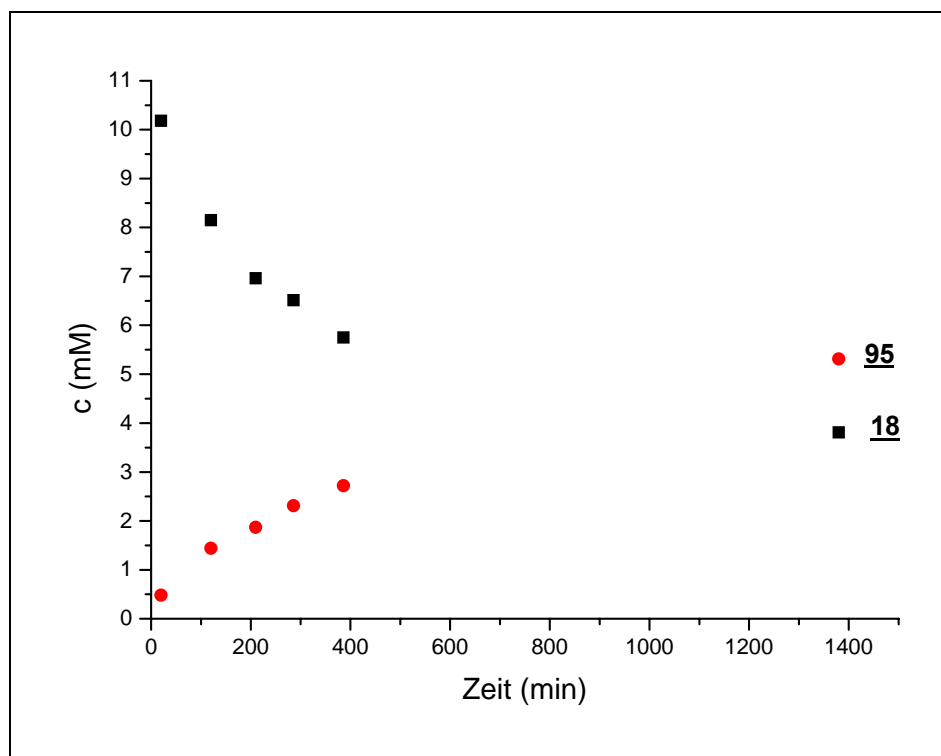


Abb. 47: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol 18 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

Wie die Abbildung 47 zeigt, kam die Reaktion nach einem Tag zum Stillstand. Es reagierten ca. 6 mM Bis(guanidinium)naphthol 18 ab.

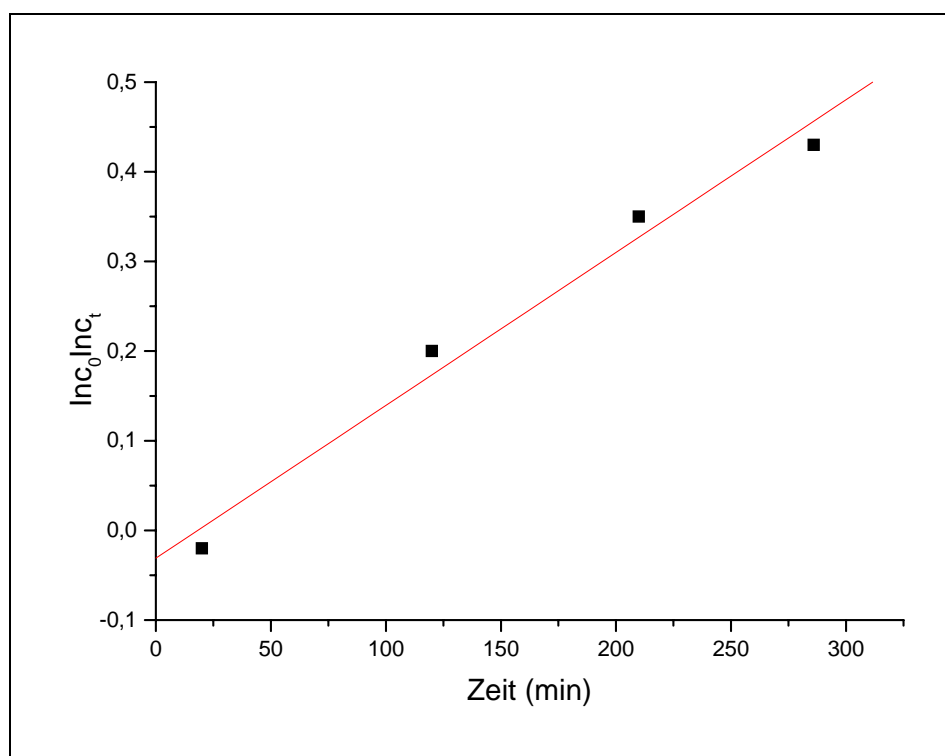


Abb. 48: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen **18** und 2,4-BDNPP **5**.

Aus der Abbildung 48 wurde ein linearer Zusammenhang für die ersten vier Messung abgeleitet. Damit gehorcht die Reaktion in der Anfangsphase (280min) dem Reaktionsgesetz erster Ordnung, mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.1.2.3.2 Reaktion in DMF/Trispuffer (2:1) pH 8.99

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol **18**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 8.99, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

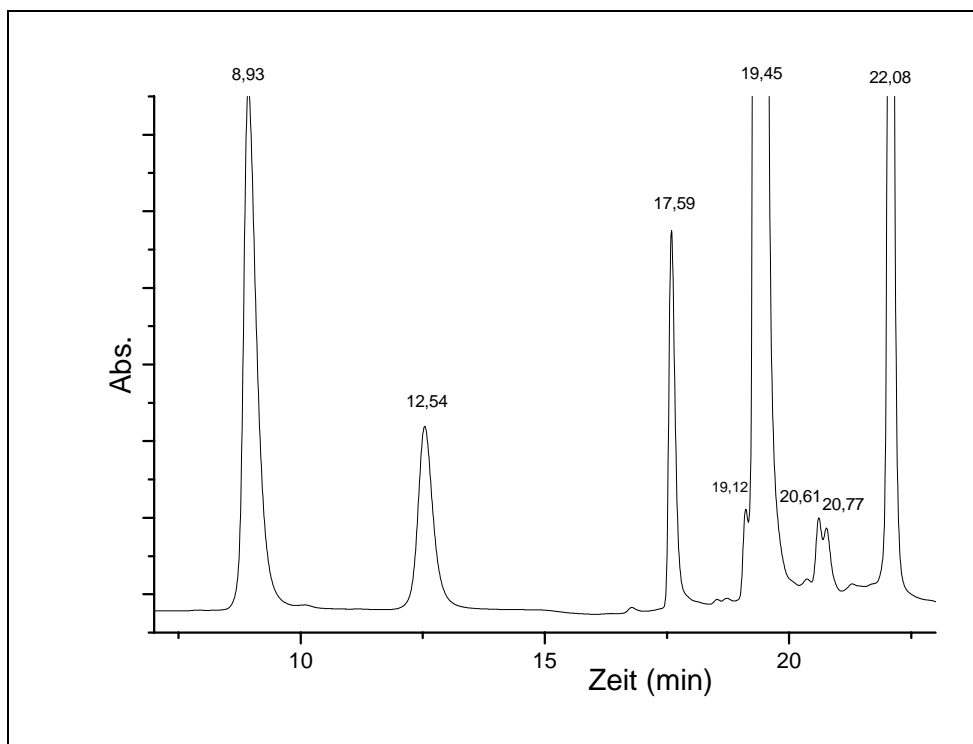


Abb. 49: Elutionsprofil nach 386 min. Wegen der besseren Darstellung des Elutionsprofils wurde dieser stark vergrößert. Für die Integration der Peaks wurde aber die volle Darstellung verwendet.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

8.93 min : Pikrinsäure

12.54 min: 2,4-Dinitrophenol 95

17.59 min: Bis(guanidinium)naphthol 18

19.12 min: freies Phosphat 22

19.45 min: 2,4-BDNPP 5

20.77 min: Unbekannt

20.61 min: O-Phosphat 21

22.08 min: 1-Nitronaphthalin 92

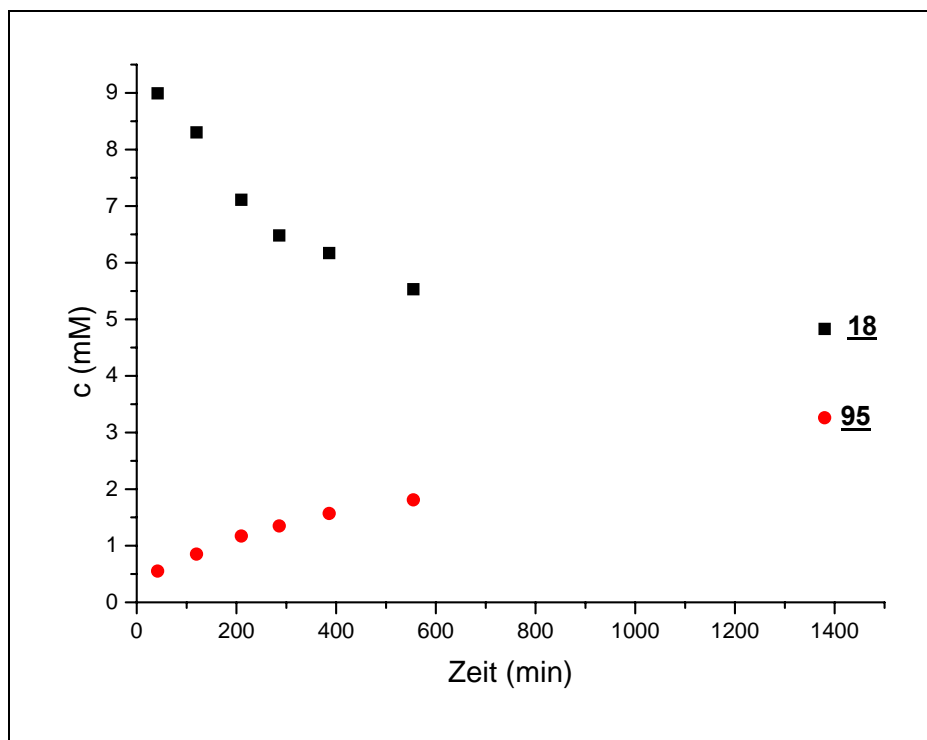


Abb. 50: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-Dinitrophenol **95** mit der Zeit.

Abbildung 50 lässt erkennen, daß nach 24 h die Reaktion zum Stillstand kam. Es reagierten ca. 4.5 mM Bis(guanidinium)naphthol **18** ab.

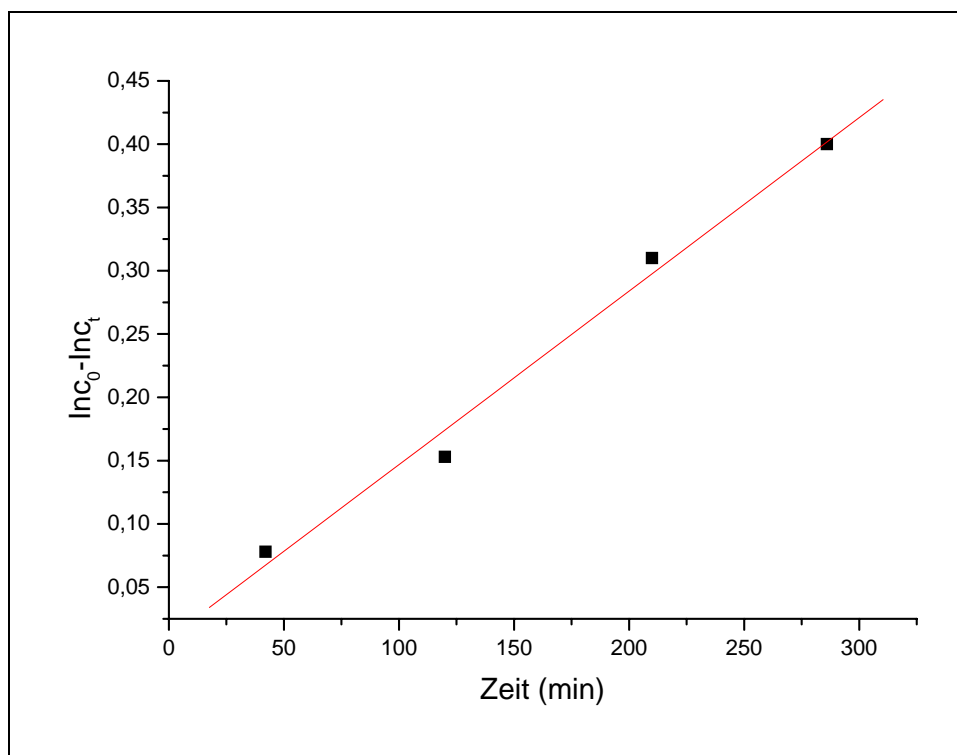


Abb. 51: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen **18** und 2,4-BDNPP **5**.

Aus der Abbildung 51 kann man für die ersten vier Messungen einen linearen Zusammenhang ableiten. Damit handelte es sich für die Abnahme des Bis(guanidinium)naphthols **18** in der Anfangsphase (280min) um eine Reaktion erster Ordnung mit der folgenden Geschwindigkeitskonstanten:

$$k_{\text{obs}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.1.2.3.3 Reaktion in DMF/Trispuffer (2:1) pH 7.09

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol **18**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 7.09, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

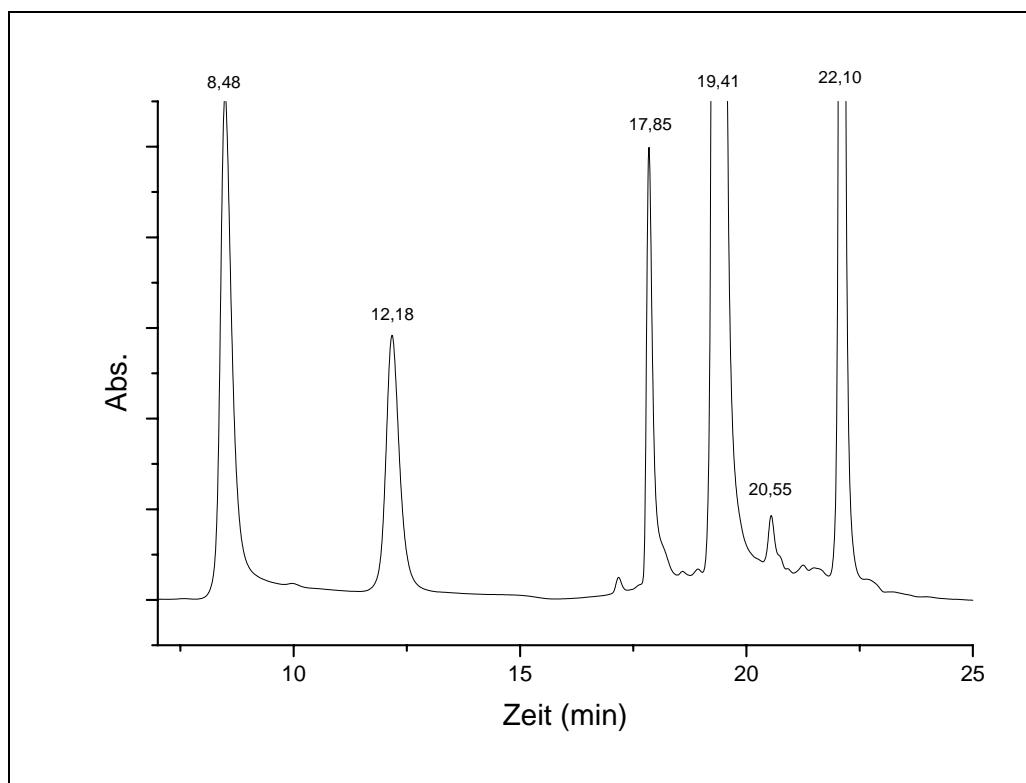


Abb. 52: Elutionsprofil nach 450 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

8.48 min : Pikrinsäure

12.12 min: 2,4-Dinitrophenol 95

17.85 min: Bis(guanidinium)naphthol 18

19.41 min: 2,4-BDNPP 5

20.55 min: O-Phosphat 21

22.08 min: 1-Nitronaphthalin 92

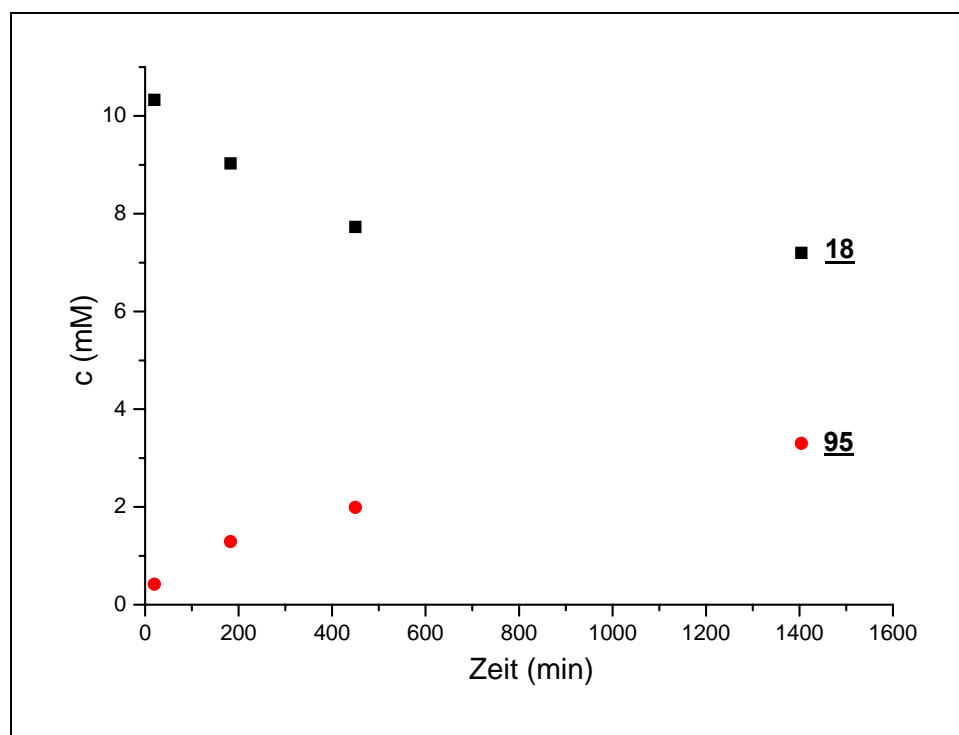


Abb. 53: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol 18 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

Wie die Abbildung 53 zeigt, kam die Reaktion nach 24 h zum Stillstand. Es reagierten ca. 2 mM Bis(guanidinium)naphthol 18 ab.

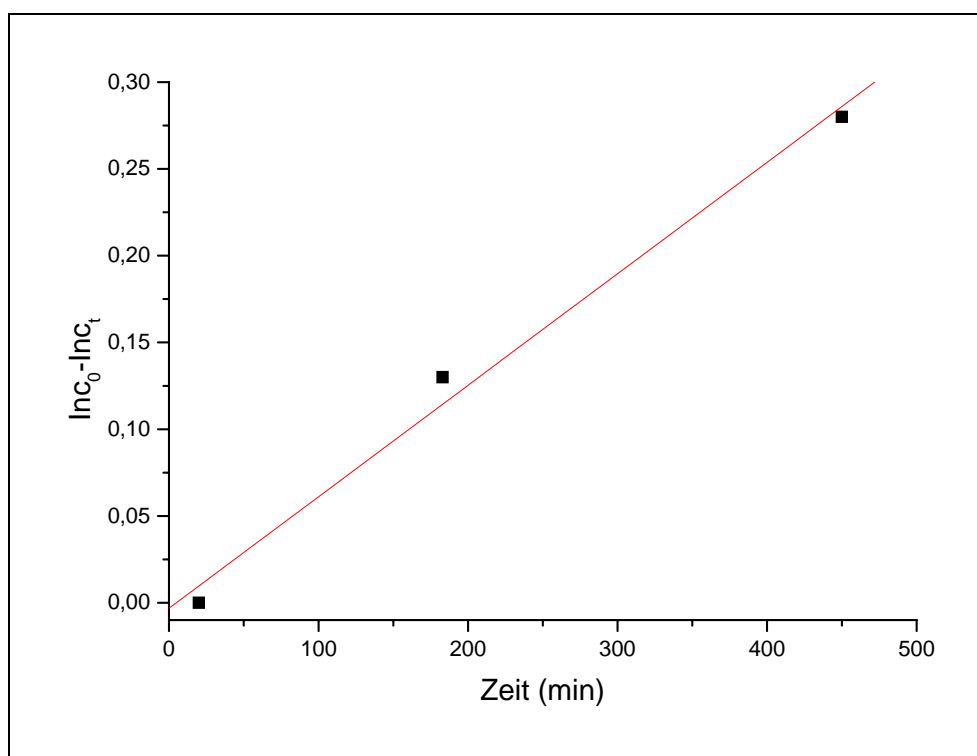


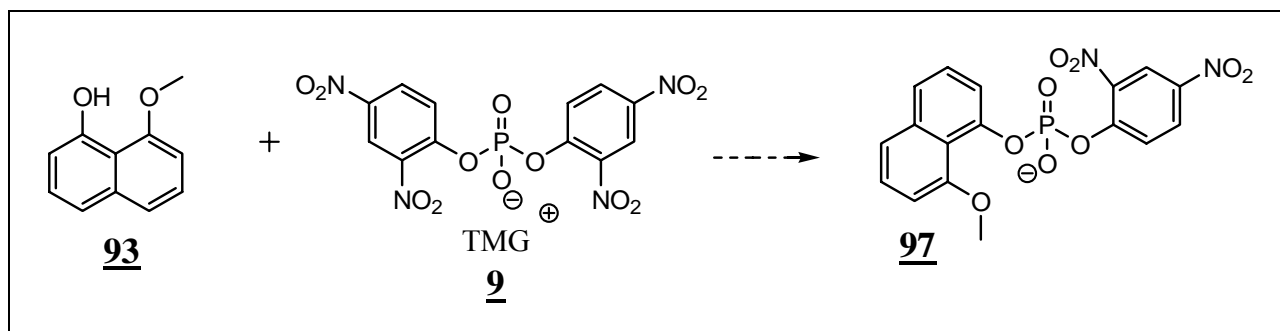
Abb. 54: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen **18** und 2,4-BDNPP **5**.

Aus der Abbildung 54 kann man für die ersten drei Messungen einen linearen Zusammenhang ableiten. Damit handelte es sich für die Abnahme des Bis(guanidinium)naphthols **18** in der Anfangsphase (280min) um eine Reaktion erster Ordnung:

$$k_{\text{obs}} = 6.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

8.3.2 Referenzreaktionen

8.3.2.1 Reaktion von 1-Methyldiol 93 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin in DMF/Base



Reaktionsbedingung: 8-Methoxy-naphthalin-1-ol **93**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient B.

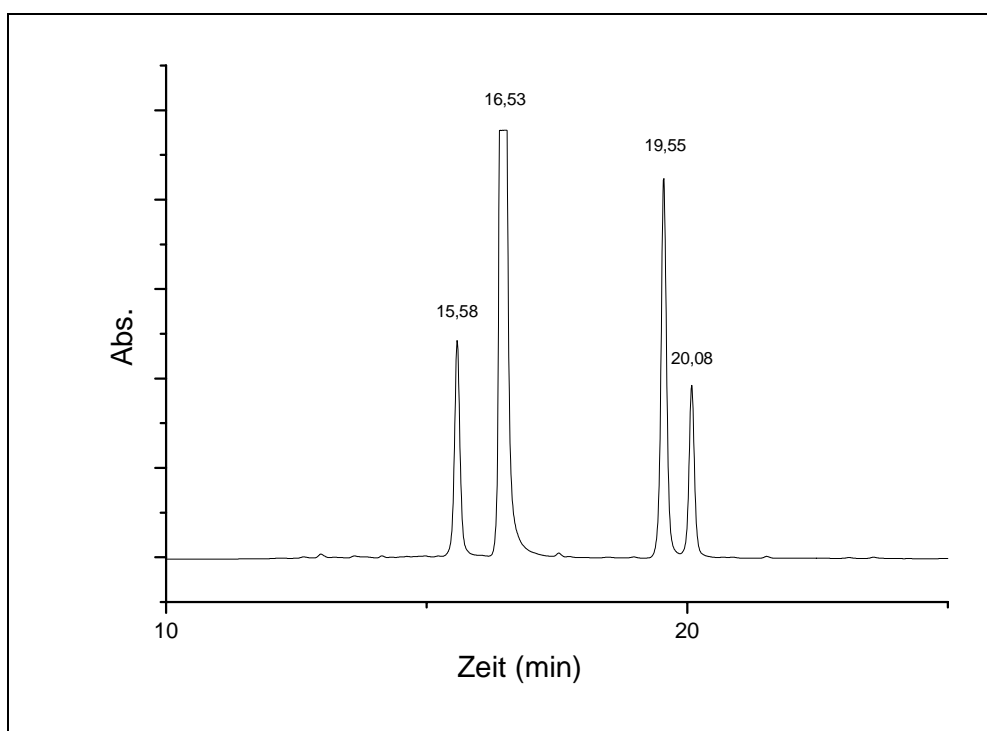


Abb. 55: Elutionsprofil nach 1243 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

15.58 min: 2,4-Dinitrophenol 95 (bei $t = 0$ war dieser Peak noch nicht vorhanden)

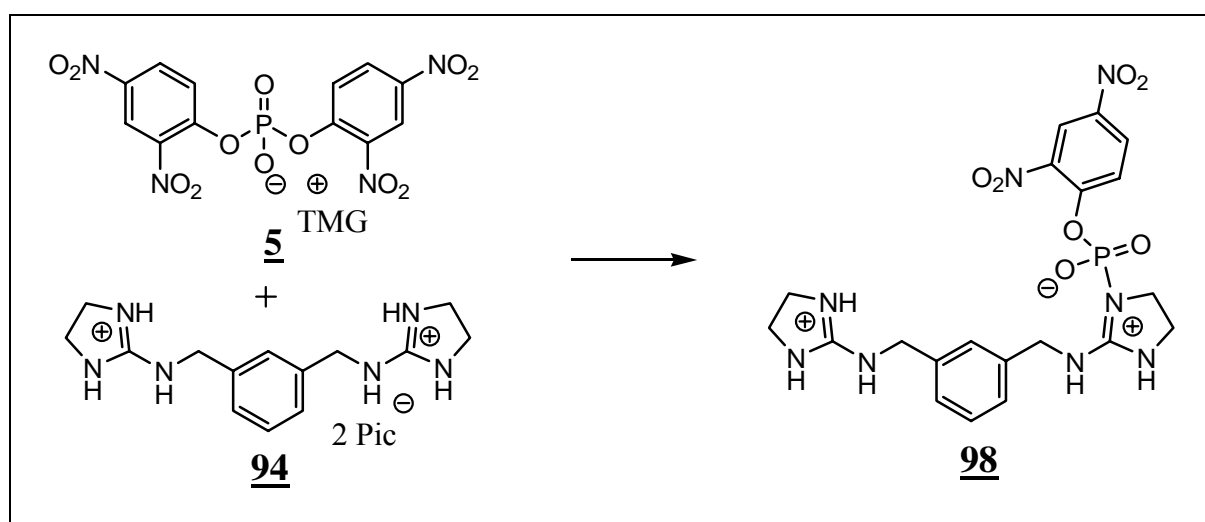
16.53 min: 2,4-BDNPP 5

19.55 min: 1-Methyldiol 93

20.08 min: 1-Nitronaphthalin 92

Wie die Abbildung 55 zeigt, setzt sich das einfache Naphthol 93 auch in einem längeren Zeitraum nicht mit Substrat 5 um. Denn auch in ^{31}P -NMR (400 MHz) und in ESI^+ war kein Signal zu sehen. Dadurch konnte gezeigt werden, daß für die Katalyse durch das Bis(guanidinium)naphthol 18 sein Guanidiniumkerngerüst 94 essentiell ist.

8.3.2.2 Reaktion von Bisguanidinium 94 mit Phosphorsäure-bis-(2,4-dinitrophenyl)-ester5, Salz mit Tetramethylguanidin in DMF/Base



Reaktionsbedingung: Bisguanidinium 94: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient B.

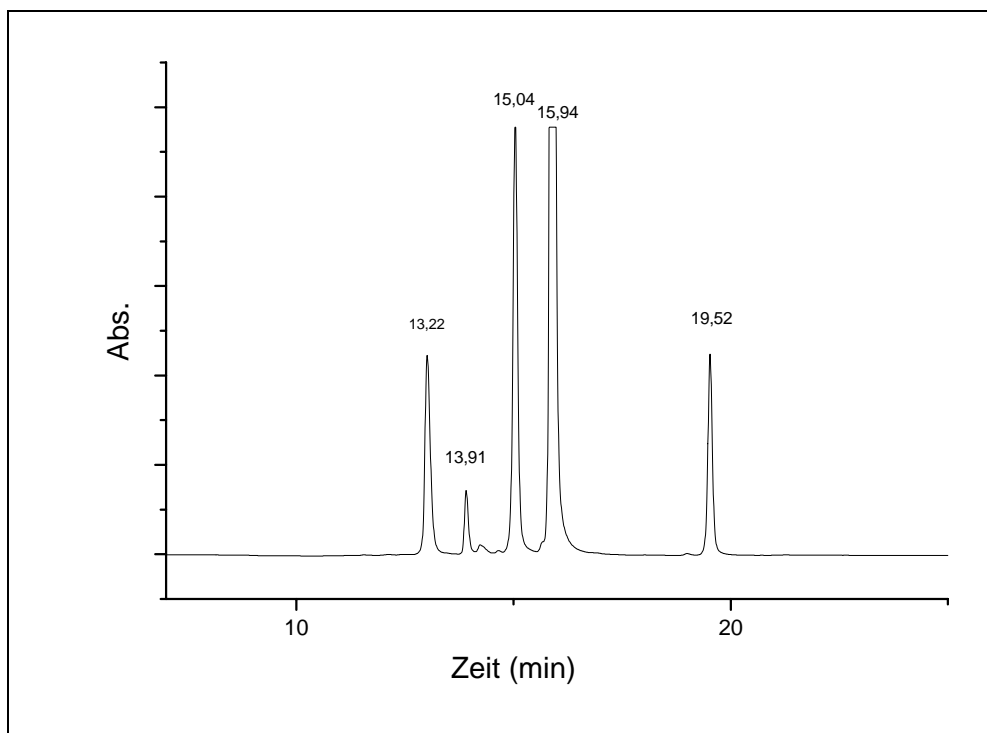


Abb. 56: Eluationsprofil nach 1204 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

13.22 min: Pikrinsäure

13.91 min: mutmaßlicher N-Phosphat **98**

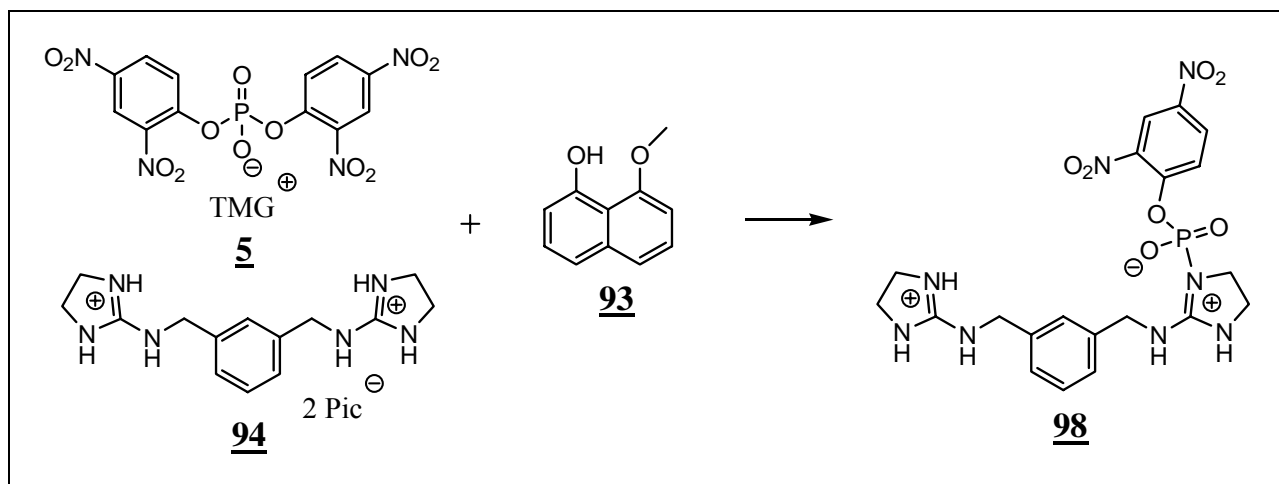
15.04 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

15.94 min: 2,4-BDNPP **5**

19.54 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie die Abbildung zeigt 56, entsteht langsam eine neue Verbindung. Es könnte sich dabei um das vermutliche N-Phosphat **98** handeln. Daß unter diesen Bedingungen das N-Phosphat **98** entsteht, wurde bereits von M.S. Muche⁶ gefunden.

8.3.2.3 Reaktion von Bisguanidinium 94 und 1-Methyldiol 93 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin in DMF/Base



Reaktionsbedingung: Bisguanidinium 94: 10 mM, 1-Methyldiol 93: 10mM 2,4-BDNPP 5: 30mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient B.

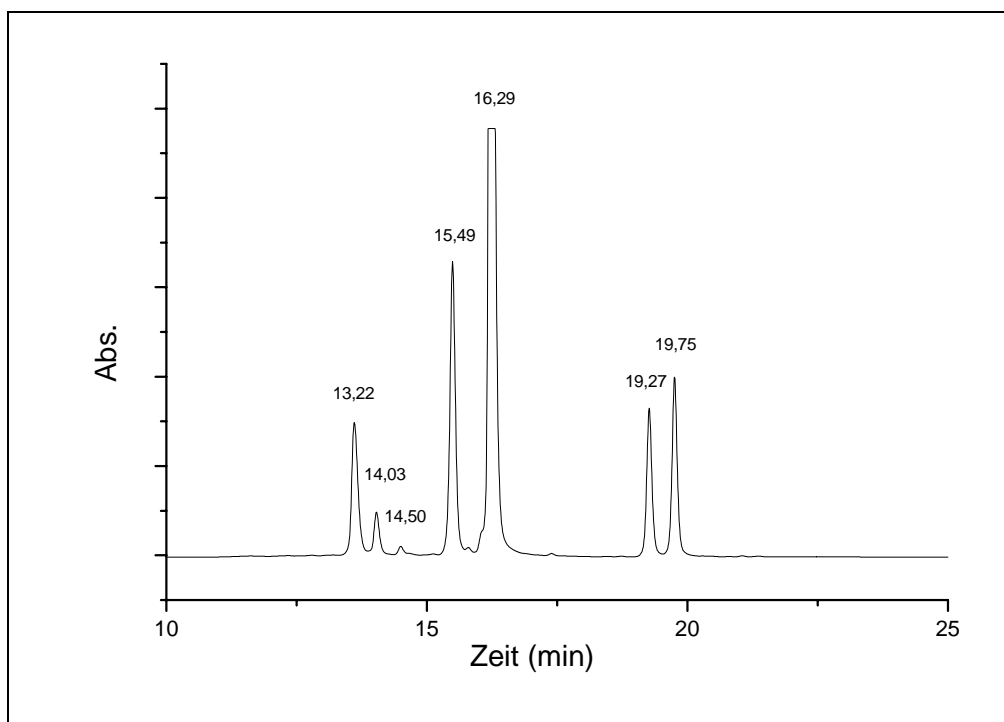


Abb. 57: Eluationsprofil nach 1184 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

13.22 min: Pikrinsäure

14.03 min: mutmaßlicher N-Phosphat **98**

14.05 min: Unbekannt

15.49 min: Bisguanidinium **94** und 2,4-Dinitrophenol **95**

16.29 min: 2,4-BDNPP **5**

19.27 min: 8-Methoxynaphthol **93**

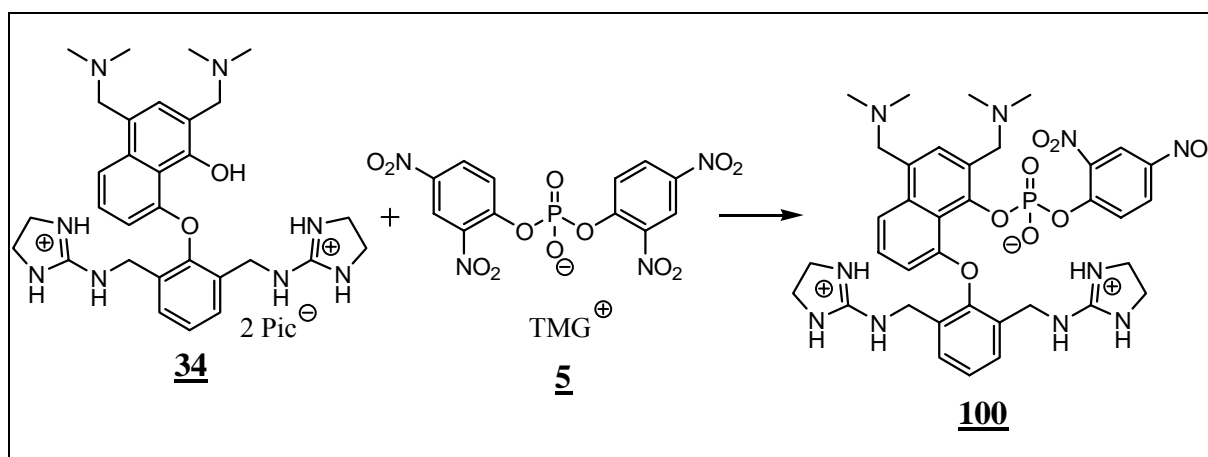
19.75 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie die Abbildung 57 zeigt, entsteht auch in Anwesenheit von 1-Methydiol ausschließlich nur das mutmaßliche N-Phosphat **98**. Zur Erinnerung (siehe 8.3.1): Die Halbwertszeit für die Phosphorylierung des Bis(guanidinium)naphthols **18** beträgt unter diesen Bedingungen nur wenige Minuten! Damit kann man diese Reaktion für die Reaktion zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 2,4-BDNPP **5** ausschließen.

8.3.3 Reaktionen von Bis(mannich)naphthol 34 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin

8.3.3.1 Reaktion in Abwesenheit von Wasser

8.3.3.1.1 Reaktion in DMF/Base



Reaktionsbedingung: Bis(mannich)naphthol 34: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylamin : 250 mM, abs. DMF, 30 °C. Gemessen mit Gradient B.

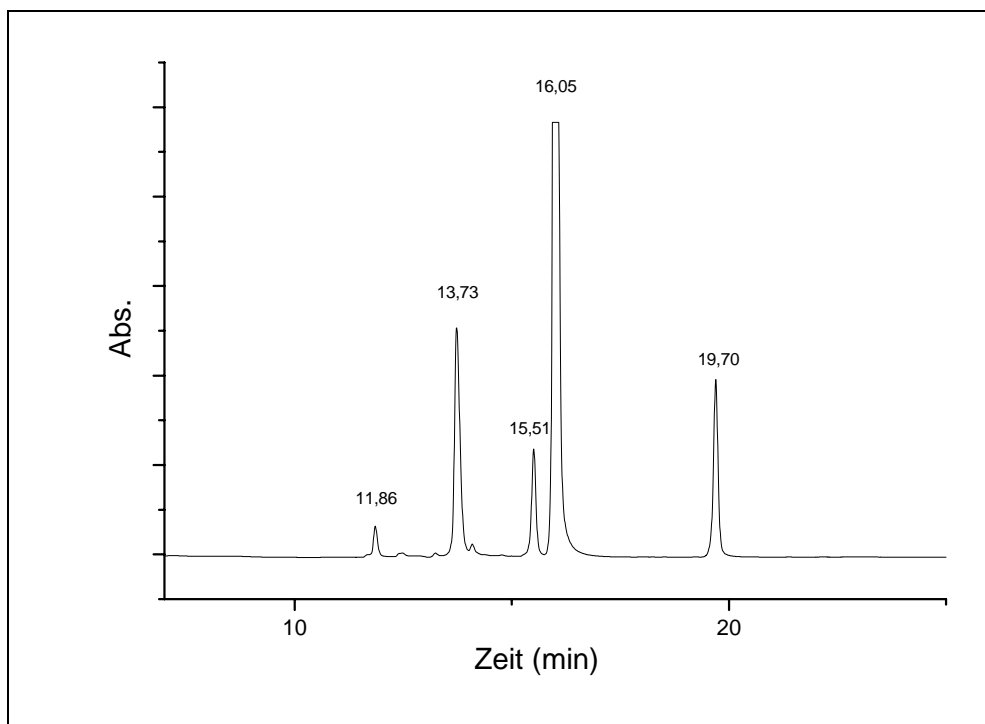


Abb. 58: Elutionsprofil nach 90 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

11.86 min: Bis(mannich)naphthol **34**

13.73 min: Pikrinsäure

15.51 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

16.05 min: 2,4-BDNPP **5** und O-Phosphat **100** (^{31}P -NMR: Signal bei -11.2 ppm)

19.70 min: 1-Nitronaphthalin **92**

In der Abbildung 58 ist nur der Peak für das 2,4-Dinitrophenol **95** zusehen. Um zu beweisen, daß bei der Reaktion das O-Phosphat **100** entsteht, wurde die Reaktion in einem größeren Maßstab durchgeführt und am Ende von der Lösung ein ^{31}P -NMR (400 MHz) aufgenommen. Dabei war ein Signal (-11.20 ppm) zusehen. Dieser ^{31}P -Shift war mit dem von O-Phosphat **21** (^{31}P -NMR: Signal bei -11.40 ppm) vergleichbar. Folglich muß bei der Reaktion das O-Phosphat **100** entstehen und aus dem Vergleich mit der Retentionszeit von O-Phosphat **21**, sollte sein Peak mit dem von 2,4-BDNPP **5** zusammenfallen.

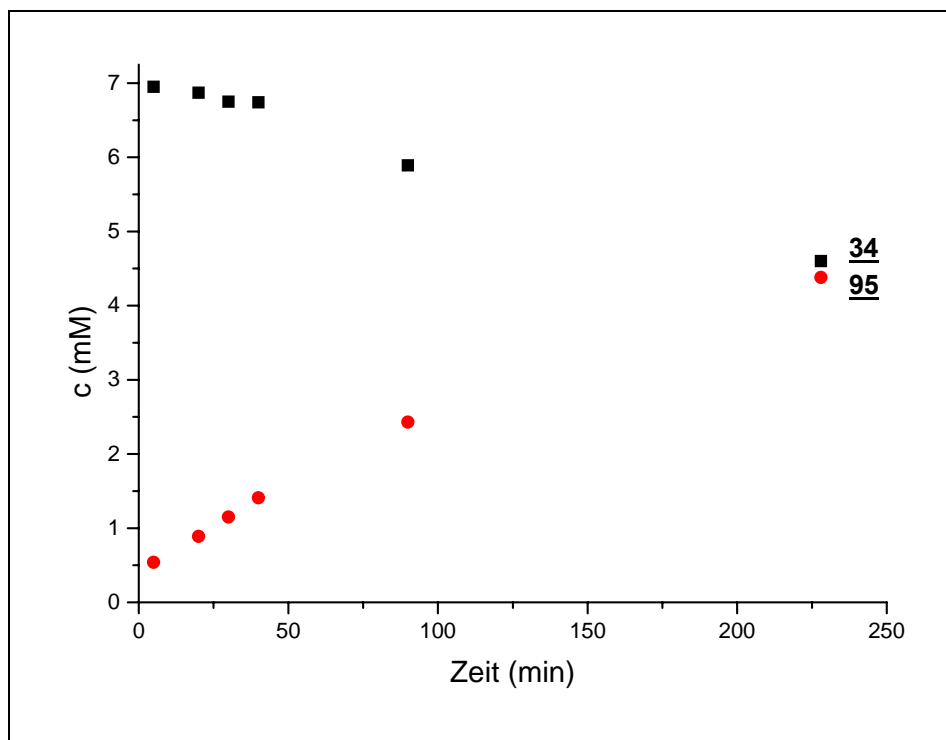


Abb. 59: Die Konzentrationsänderung von Bis(mannich)naphthol 34 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

Wie die Abbildung 59 zeigt, nimmt die Bildung von 2,4-Dinitrophenol stärker zu als die Abnahme von Bis(mannich)naphthol 34. Der Grund dafür könnte in einer Hintergrundhydrolyse von 2,4-BDNPP 5 liegen.

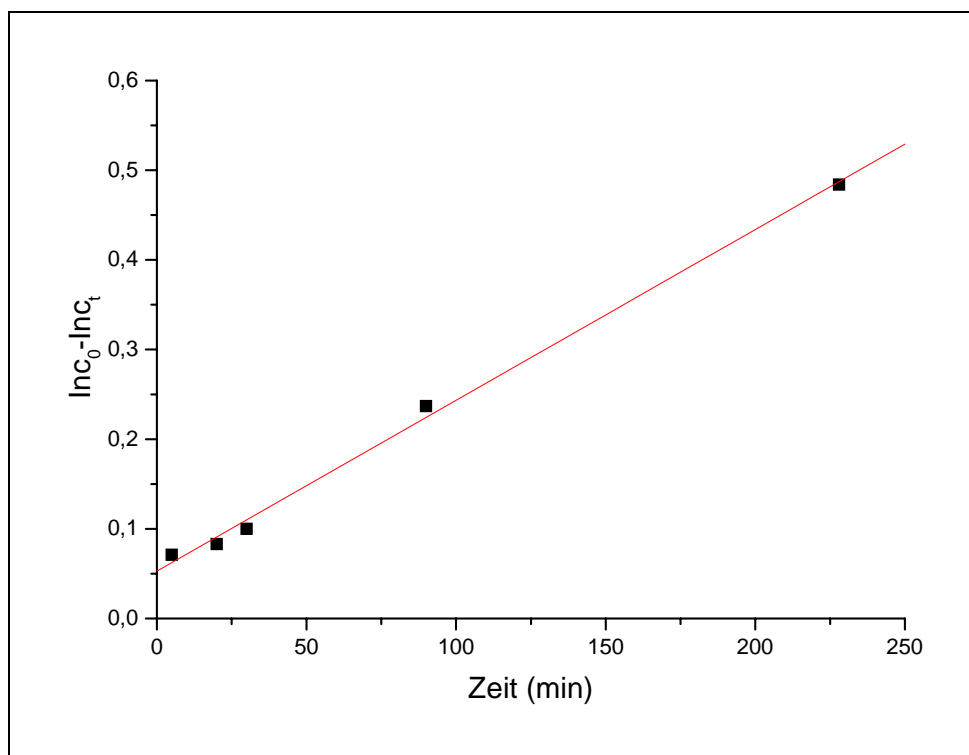


Abb. 60: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 34 und 2,4-BDNPP 5.

Aus der Abbildung 60 kann man einen linearen Zusammenhang ableiten. Damit handelte es sich für die Abnahme des Bis(mannich)naphthols **34** um eine Reaktion erster Ordnung mit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von

$$k_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.3.2 Reaktion in Anwesenheit von Wasser

8.3.3.2.1 Reaktion in DMF/Trispuffer (2:1) pH 10.6

Reaktionsbedingung: Bis(mannich)naphthol **34**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 10.6, 30 °C. Gemessen mit Gradient B.

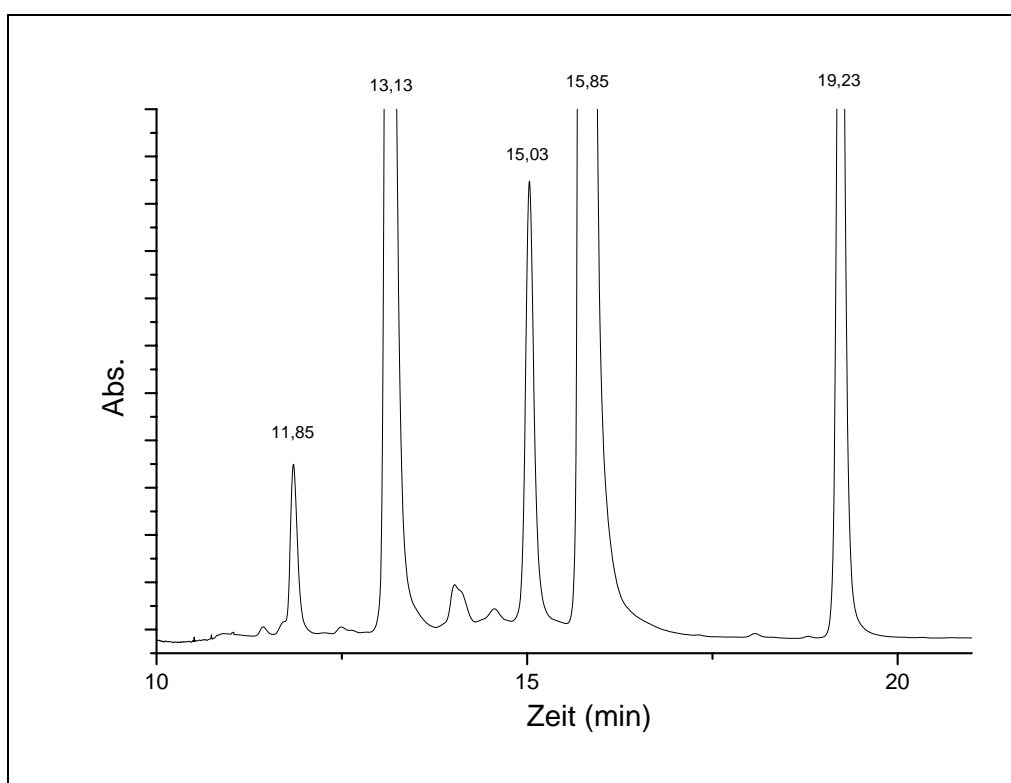


Abb. 61: Elutionsprofil nach 90 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

11.85 min: Bis(mannich)naphthol **34**

13.13 min: Pikrinsäure

15.03 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

15.85 min: 2,4-BDNPP **5**

19.23 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Im Gegensatz zu der Reaktion mit Bis(guanidinium)naphthol **18** Kapitel 8.3.1.2.1 ergibt sich in diesem Fall eine sehr glatte Umsetzung zum O-Phosphat **100** (siehe Abbildung 61).

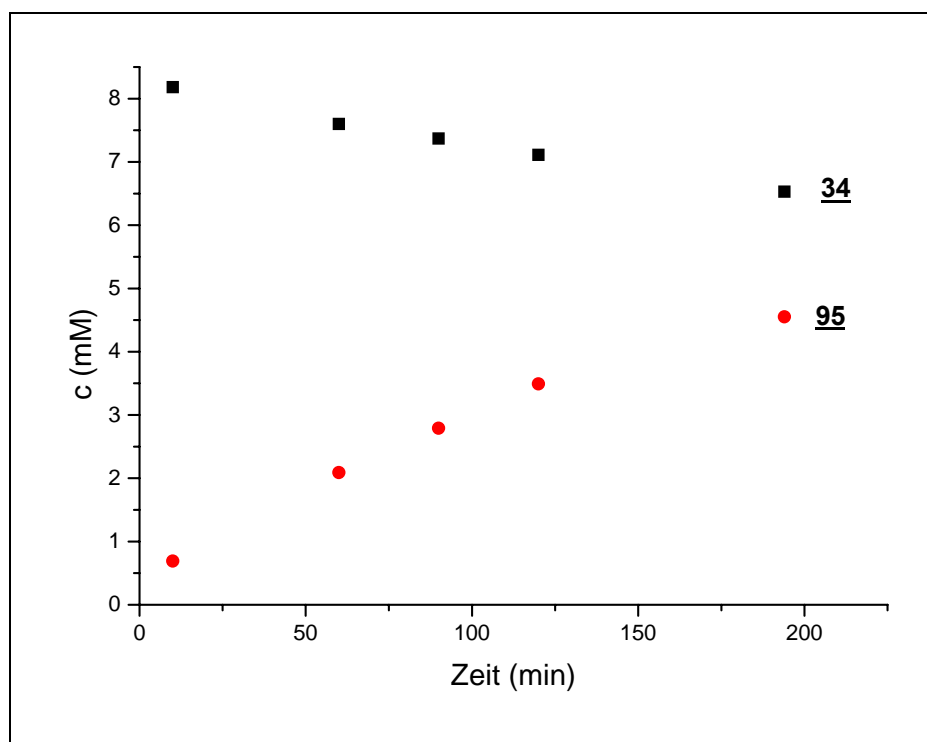


Abb. 62: Die Konzentrationsänderung von Bis(mannich)naphthol **34** und 2,4-Dinitrophenol **95** mit der Zeit.

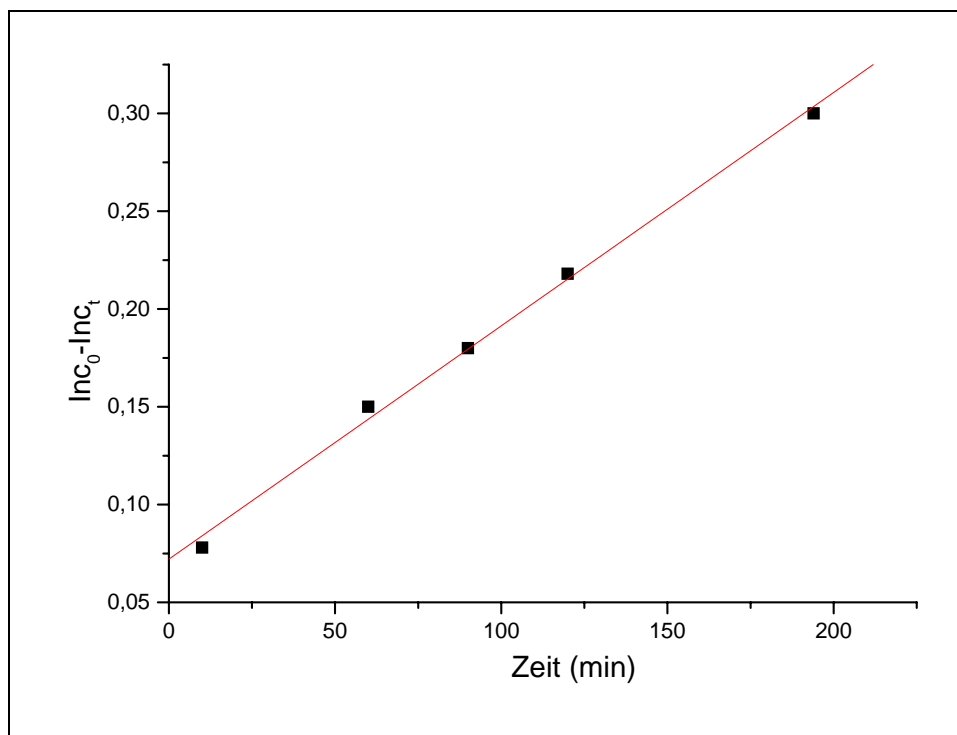


Abb. 63: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 34 und 2,4-BDNPP 5.

Aus der Abbildung 63 kann man einen linearen Zusammenhang ableiten. Damit handelte es sich für die Abnahme des Bis(mannich)naphthols 34 um eine Reaktion erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.3.2.2 Reaktion in DMF/Trispuffer pH 7.71

Reaktionsbedingung: Bis(mannich)naphthol 34: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 7.71, 30 °C. Gemessen mit Gradient B.

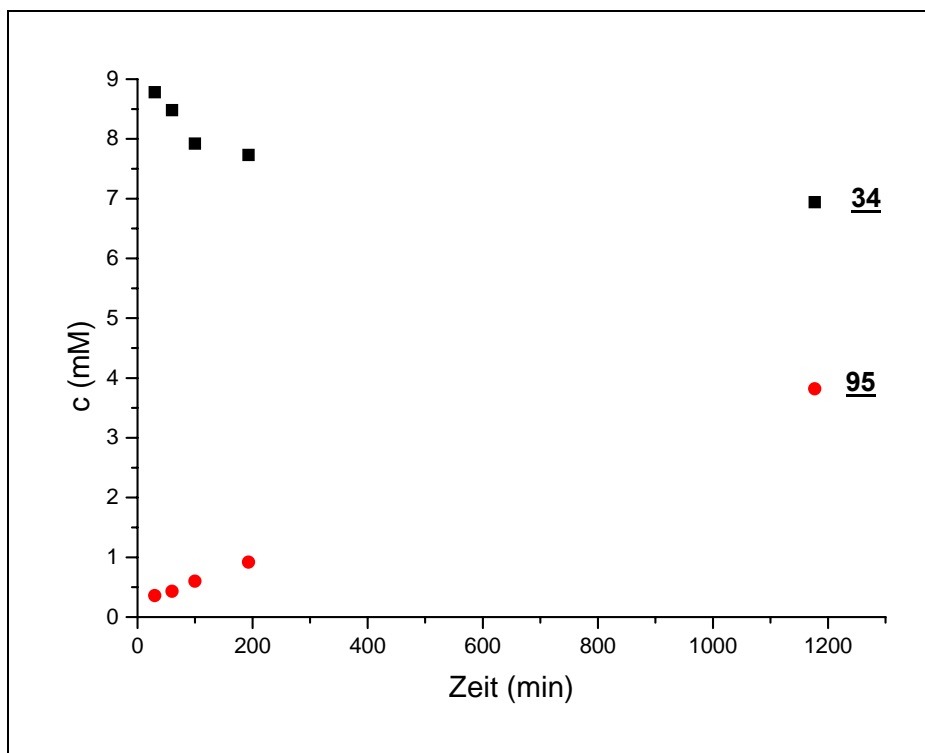


Abb. 64: Die Konzentrationsänderung von Bis(mannich)naphthol **34** und 2,4-Dinitrophenol **95** mit der Zeit.

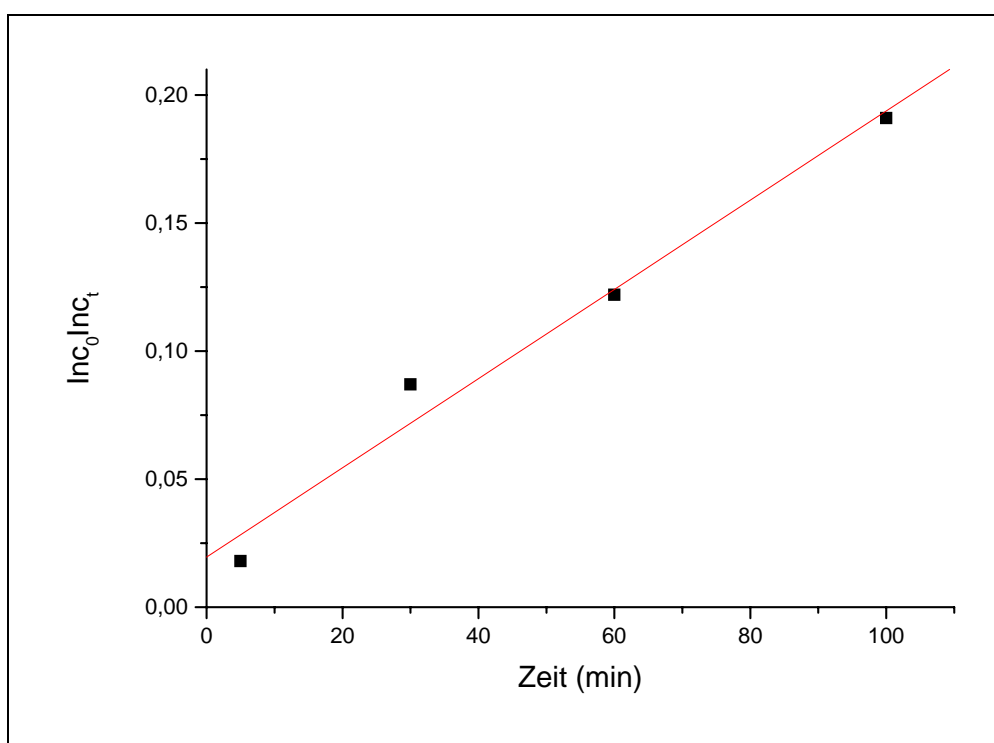


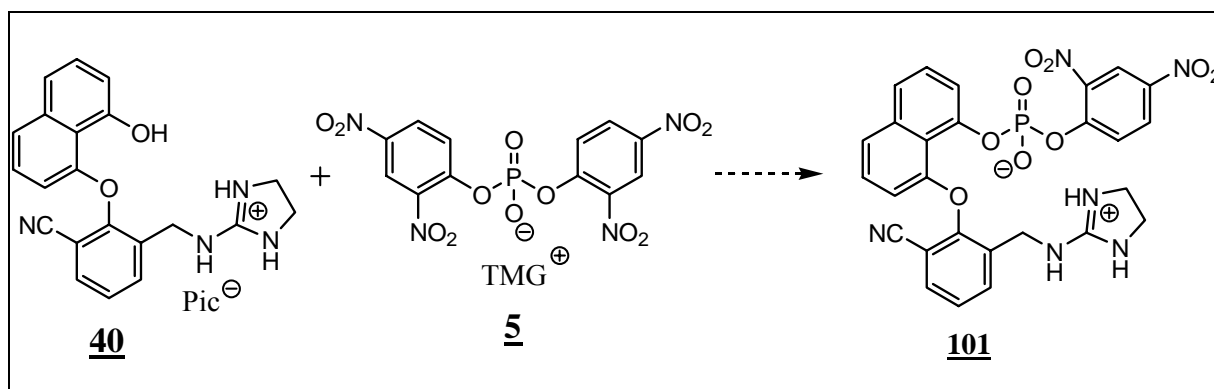
Abb. 65: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen **34** und 2,4-BDNPP **5**.

Die Abbildung 65 zeigt für die ersten vier Werte einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase um eine Reaktion erster Ordnung bezüglich Bis(mannich)naphthol 34 mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.4 Reaktionen von Mono(guanidinium)naphthol 40 mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 5, Salz mit Tetramethylguanidin

8.3.4 1 Reaktion in DMF/Base



Reaktionsbedingung: Mono(guanidinium)naphthol 40: 10 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

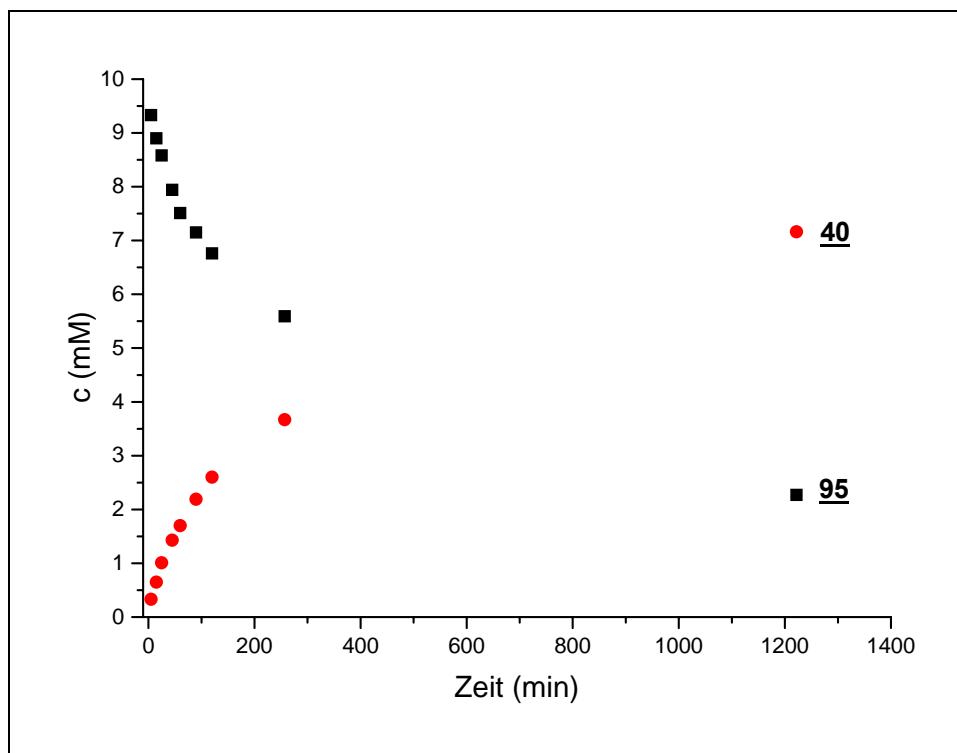


Abb. 66: Die Konzentrationsänderung von Mono(guanidinium)naphthol **40** und 2,4-Dinitrophenol **95** mit der Zeit.

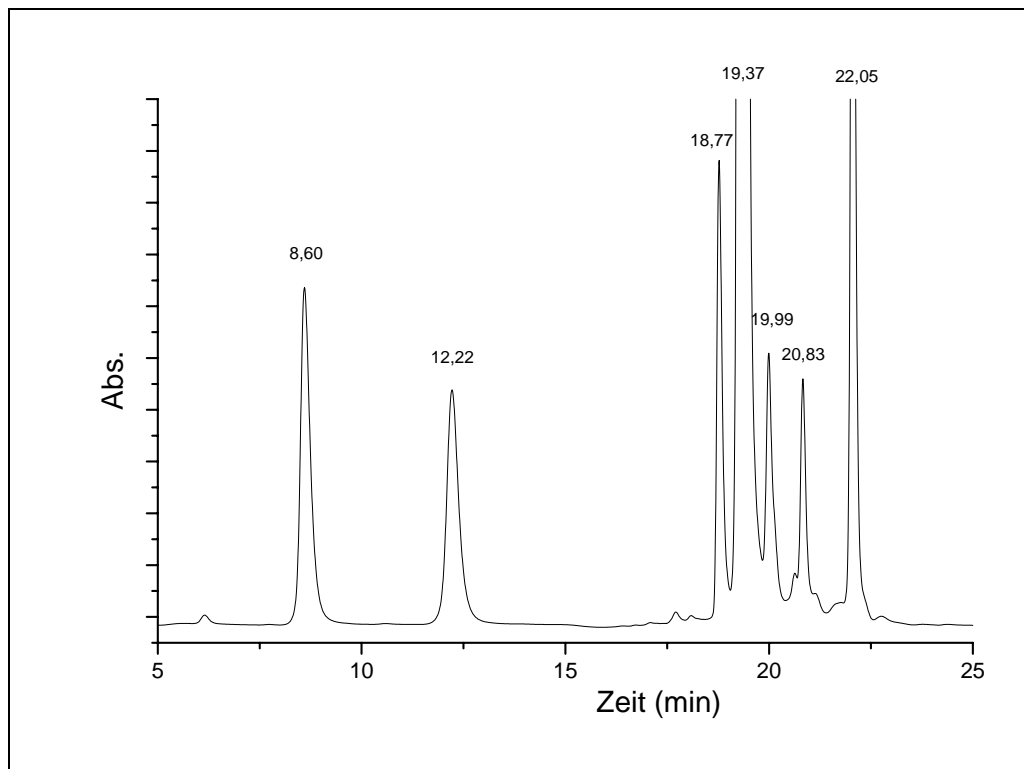


Abb. 67: Elutionsprofil nach 120 min.

Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen:

8.60 min : Pikrinsäure

12.22 min: 2,4-Dinitrophenol 95

18.77 min: Mono(guanidinium)naphthol 40

19.37 min: 2,4-BDNPP 5

19.99 min: Unbekannt

20.83 min: Unbekannt

22.05 min: 1-Nitronaphthalin 92

Wie Abbildung 67 zeigt, entstehen bei der Reaktion zwei Produkte. Dabei handelt es sich vermutlich um das O-, sowie das N-Phosphat. Eine exakte Charakterisierung dieser Produkte erfolgte nicht.

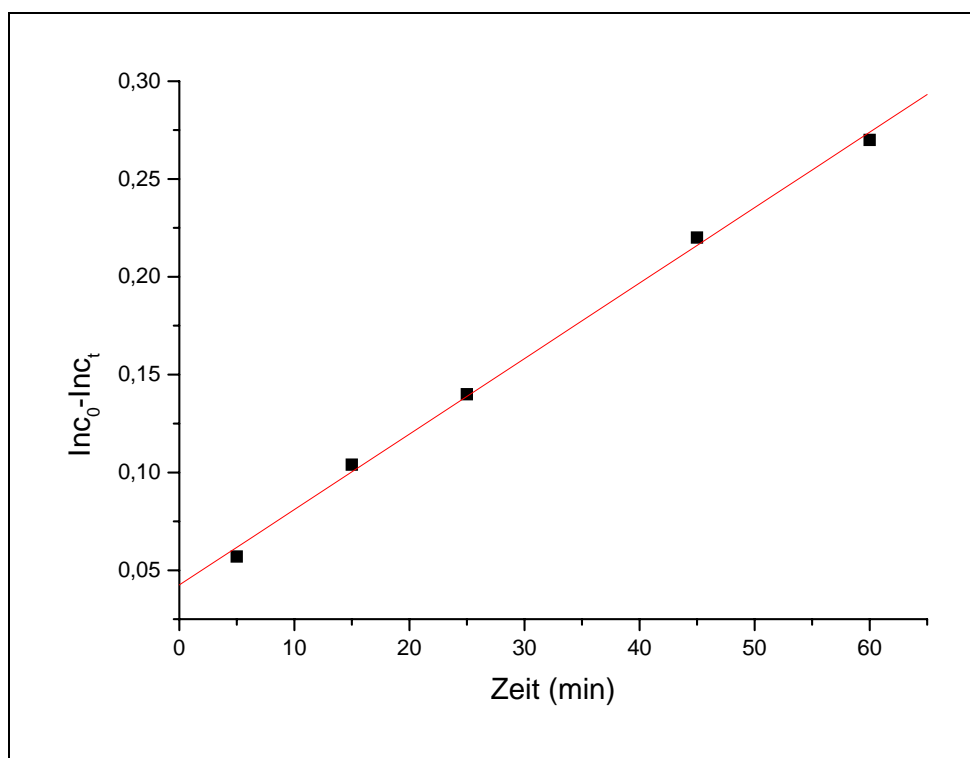


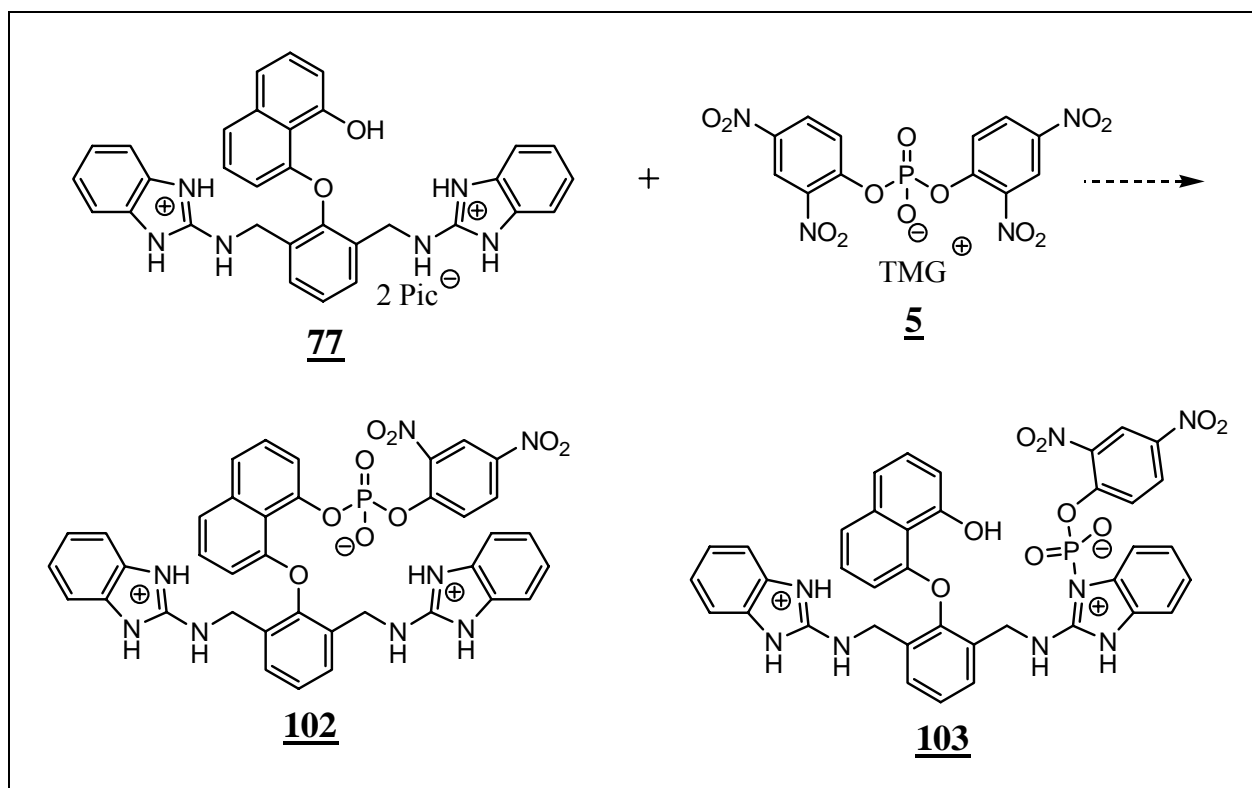
Abb. 68: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Mono(guanidinium)naphthol 40 und 2,4-BDNPP 5.

Die Abbildung 68 zeigt für die ersten fünf Messpunkte einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase bezüglich Mono(guanidinium)naphthol **40** um eine Reaktion erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 3.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.5 Reaktionen von Bis(benzimidazol)naphthol **77** mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester **5**, Salz mit Tetramethylguanidin

8.3.5.1 Reaktion in DMF/Base



Reaktionsbedingung: Bis(benzimidazol)naphthol **77**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

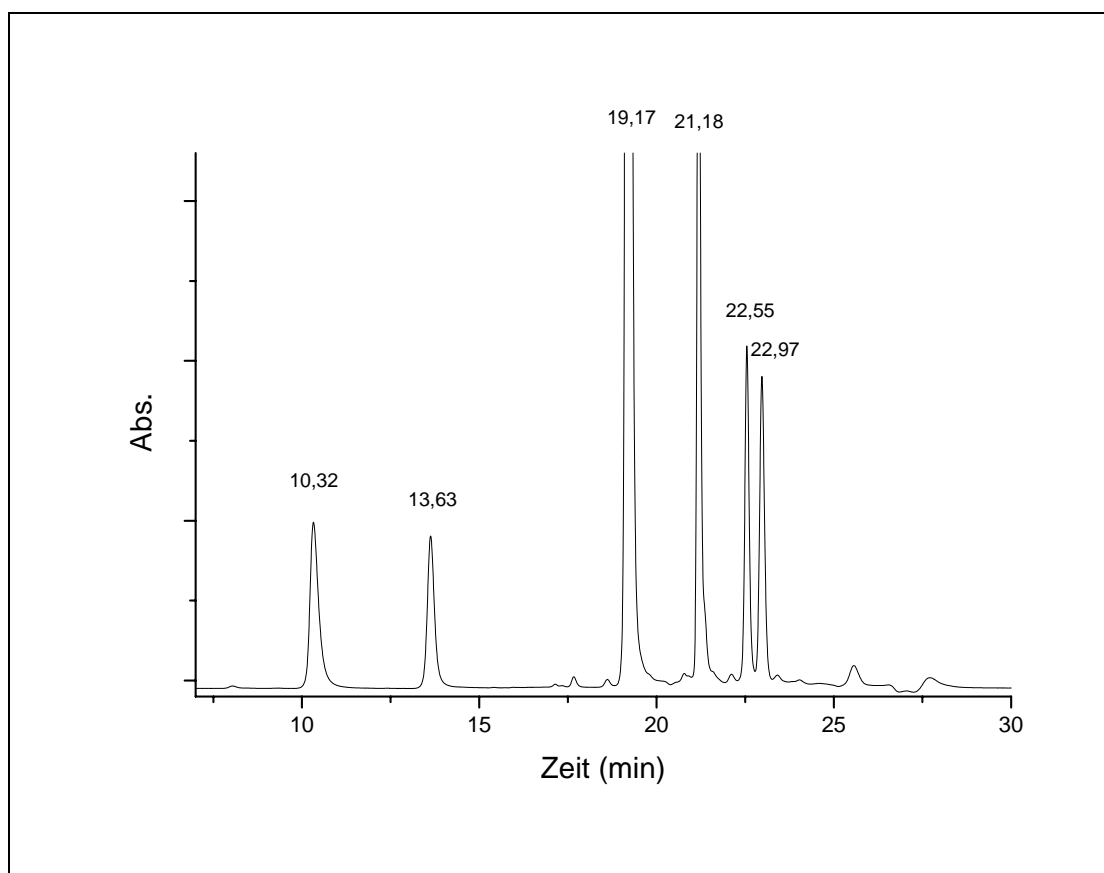


Abb. 69: Eluationsprofil nach 191 min.

10.32 min : Pikrinsäure

13.63 min: 2,4-Dinitrophenol **95**

19.17 min: 2,4-BDNPP **5**

21.18 min: Bis(benzimidazol)naphthol **77**

22.55 min: O-Phosphat **102** oder N-Phosphat **103**

22.87 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie Abbildung 69 zeigt, entsteht bei der Reaktion eine neue Verbindung (22.55 min). Eine exakte Charakterisierung dieser Verbindungen erfolgte nicht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um das N-Phosphat **103** handelt.

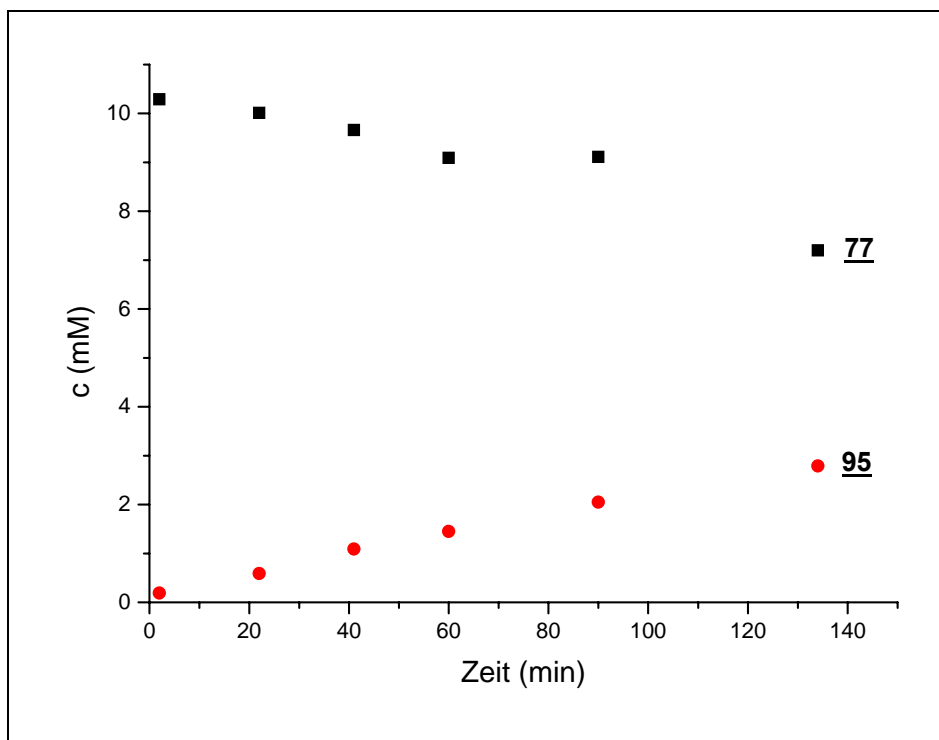


Abb. 70: Die Konzentrationsänderung von Bis(benzimidazol)naphthol 77 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

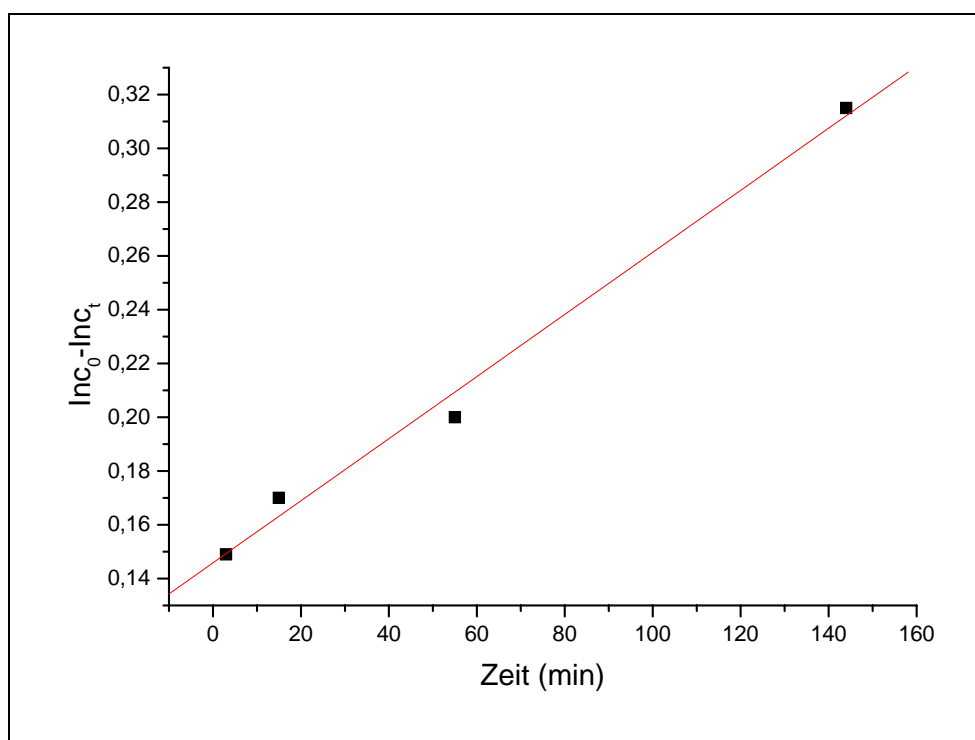


Abb. 71: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Bis(benzimidazol)naphthol 77 und 2,4-BDNPP 5.

Die Abbildung 71 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase um eine Reaktion erster Ordnung bezüglich Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 1,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.5.2 Reaktion in DMF/Trispuffer (2:1) pH 7.4

Reaktionsbedingung: Bis(benzimidazol)naphthol 77: 6 mM, 2,4-BDNPP 5: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, DMF/50 mM Tris-Puffer 2:1, pH = 7.09, 30°C. Gemessen mit Gradient A.

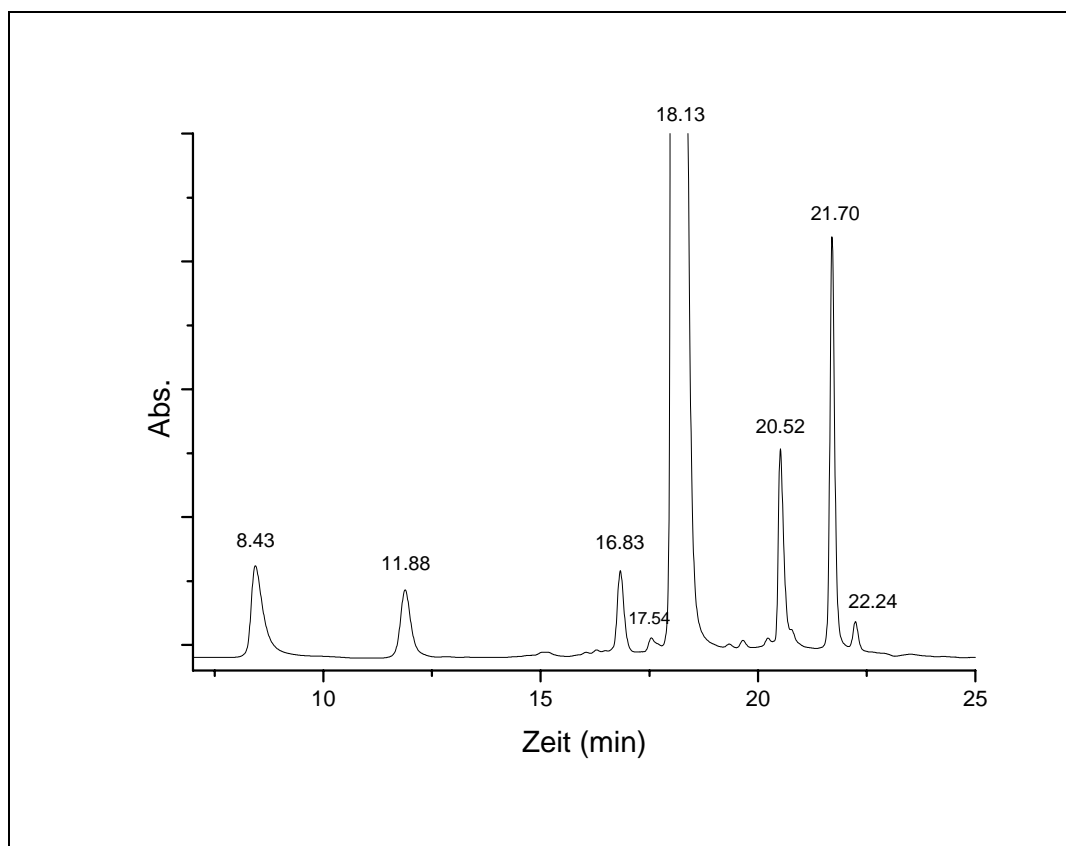


Abb. 72: Elutionsprofil nach 63 min.

8.43 min : Pikrinsäure

11.88 min: 2,4-Dinitrophenol 95
16.83 min: Unbekannt
17.54 min: Unbekannt
18.13 min: 2,4-BDNPP 5
20.52 min: Bis(benzimidazol)naphthol 77
21.70 min: 1-Nitronaphthalin 92
22.24 min: Unbekannt

Wie Abb. 72 zeigt, entstehen im Gegensatz zu der Reaktion in DMF/Hünig Base, mehrere Verbindungen. Bei Verbindung mit der Retentionszeit 22.24 min, könnte sich um die gleiche Verbindung handeln, wie in Abb. 69 (22.87 min). Auch hier erfolgte keine exakte Charakterisierung der Verbindungen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß in DMF/Trispuffer sowohl O-Phosphat 102, als auch N-Phosphat 103 entsteht.

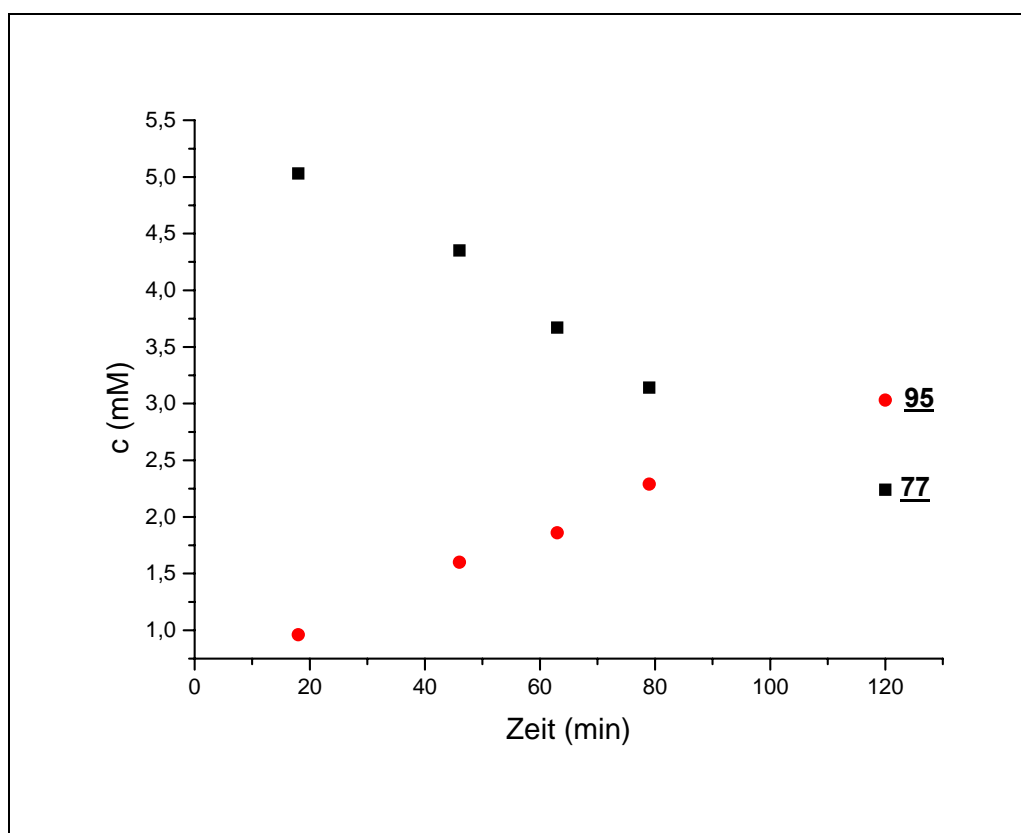


Abb. 73: Die Konzentrationsänderung von Bis(benzimidazol)naphthol 77 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

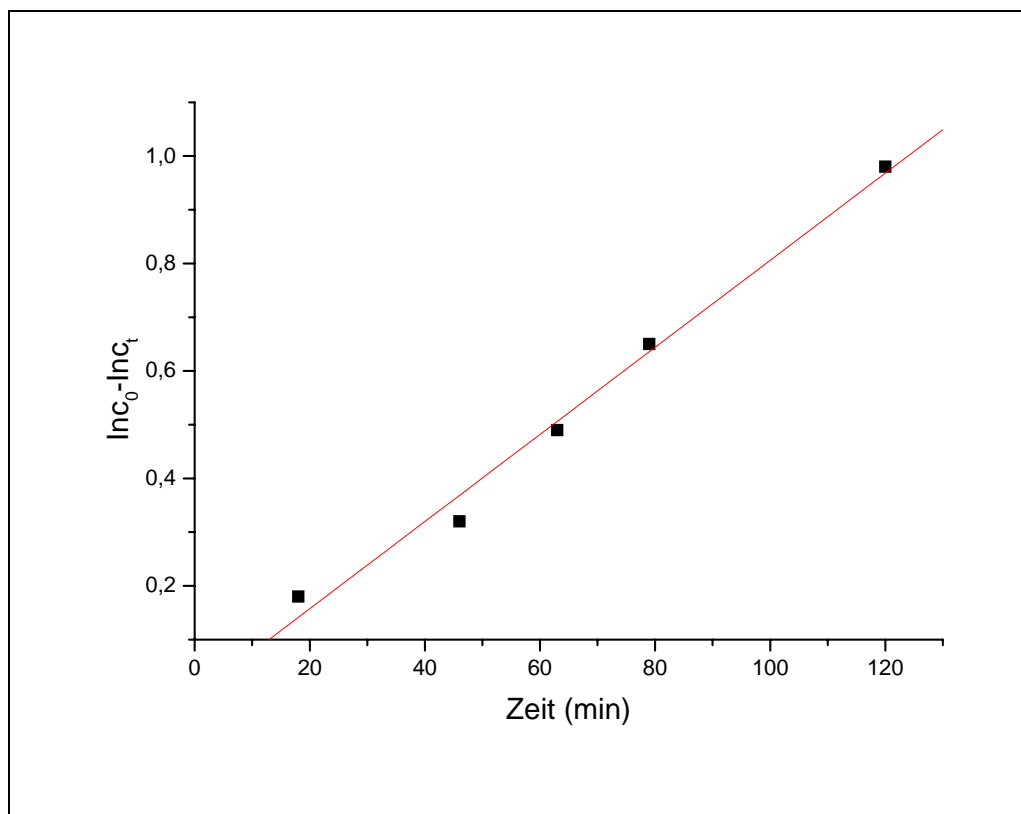


Abb. 74: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Bis(benzimidazol)naphthol 77 und 2,4-BDNPP 5.

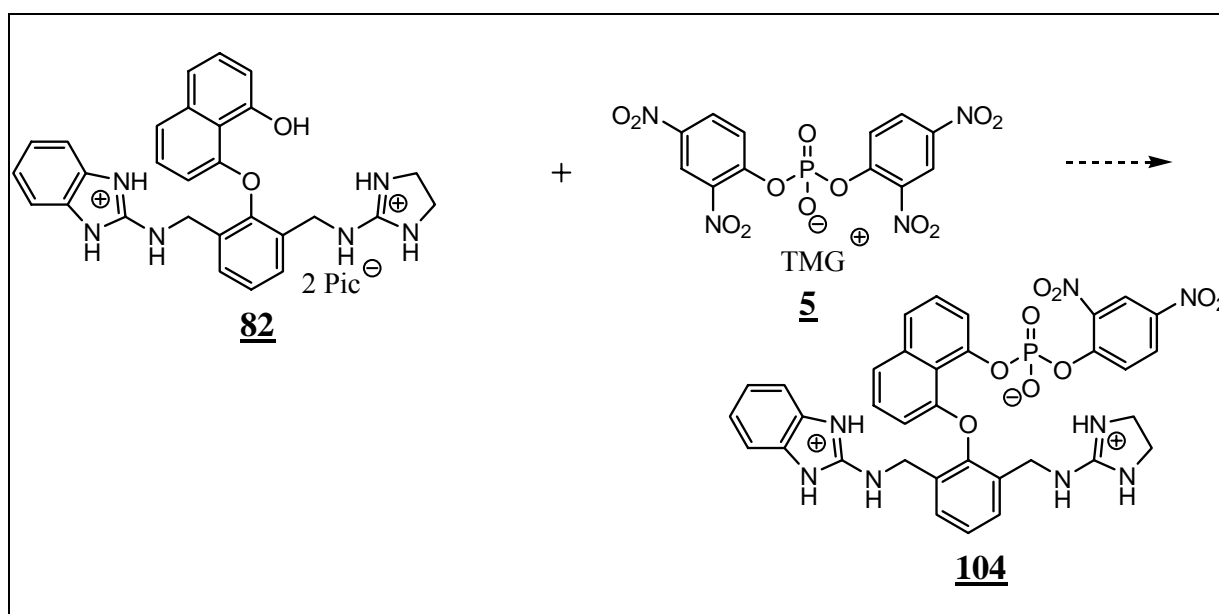
Die Abbildung 74 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase um eine Reaktion erster Ordnung bezüglich Bis(benzimidazol)naphthol 77 mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 8.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.6 Reaktion von Benzimidazol-guanidinium-naphthol **82** mit Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)ester **5**, Salz mit Tetramethylguanidin

8.3.6.1 Reaktion in DMF/Base

Reaktionsbedingung: Benzimidazol-guanidinium-naphthol **82**: 10 mM, 2,4-BDNPP **5**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30 °C. Gemessen mit Gradient A.



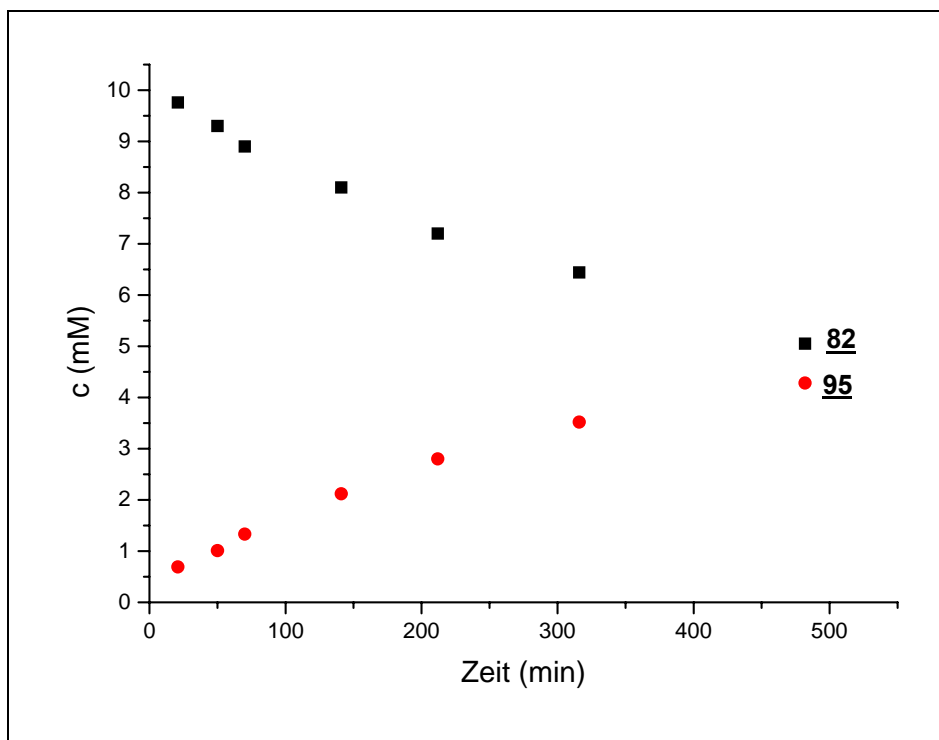


Abb. 72: Die Konzentrationsänderung von Benzimidazol-guanidinium-naphthol 82 und 2,4-Dinitrophenol 95 mit der Zeit.

Die Abbildung 72 zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Abnahme des Benzimidazol-guanidinium-naphthols 82 und der Zunahme vom 2,4-Dinitrophenol 95. Dabei entsteht nur eine Verbindung. Auch hier erfolgte keine exakte Charakterisierung dieser Verbindung. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um das N-Phosphat handelt.

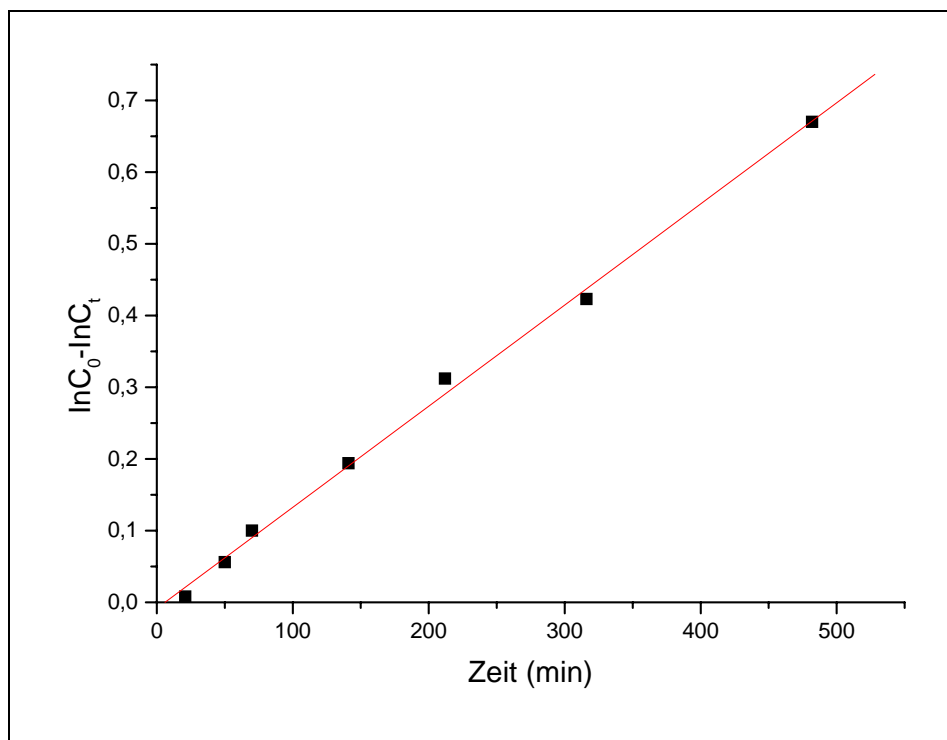


Abb. 73: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Benzimidazol-guanidinium-naphthol **82** 2,4-BDNPP **5**.

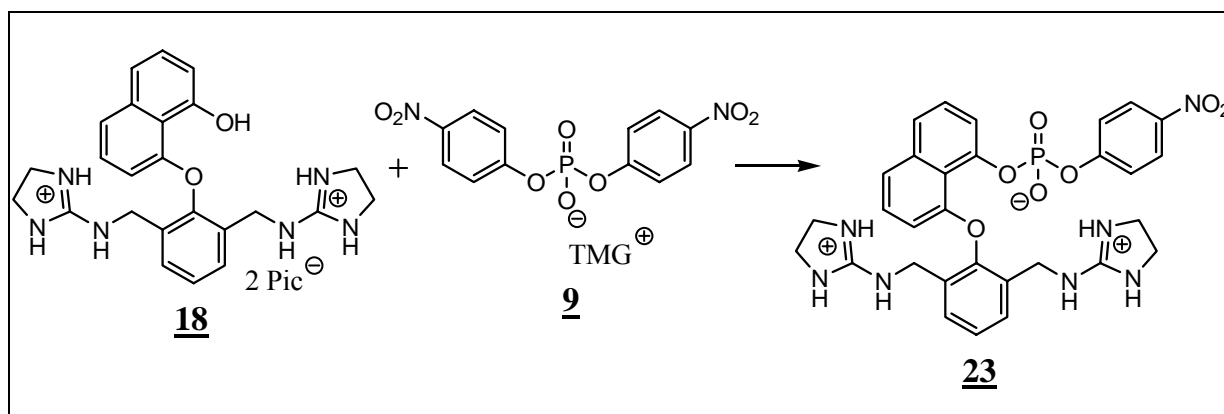
Die Abbildung 73 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase um eine Reaktion erster Ordnung bezüglich Benzimidazol-guanidinium-naphthol **82** mit der Geschwindigkeitskonstante von

$$k_{\text{obs}} = 1.41 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

8.3.7 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol 16 mit Phosphorsäure -bis(4-nitrophenyl)-ester 9, Salz mit Tetramethylguanidin

8.3.7 1 Reaktion in DMF/Base

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol 18: 10 mM, 4-BNPP 9: 30 mM, 1-Nitronaphthalin 92: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30 °C. Gemessen mit Gradient A.



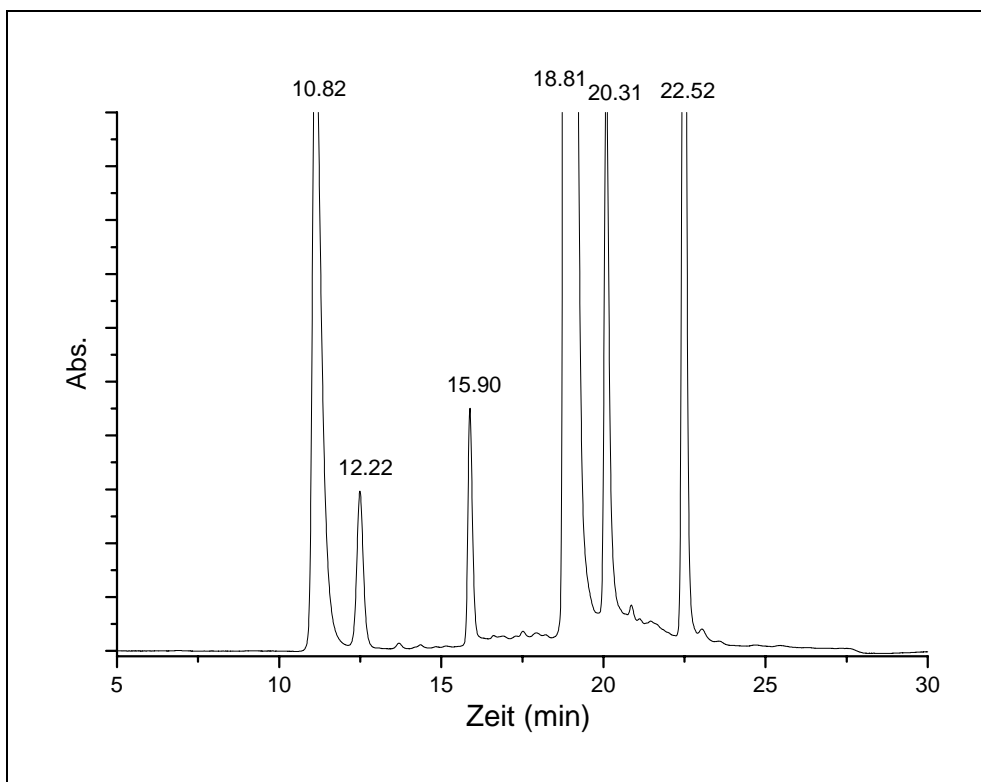


Abb. 74: Elutionsprofil nach 3 Tagen.

10.82 min : Pikrinsäure

12.20 min: 4-Nitrophenol **96**

15.90 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

18.81 min: 4-BNPP **9**

20.31 min: O-Phosphat **23** [^1H -NMR ([D]DMSO, 400 MHz), MS (ESI $^+$): 631.4 (631.19 berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}^+$) und ^{31}P NMR ([D]DMSO, 400 MHz): -11.12]

22.52 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie Abbildung 74 zeigt, entsteht bei der Reaktion von Bis(guanidinium)naphthol **18** auch mit dem weniger reaktiven 4-BNPP **9** nur eine Verbindung (20.31 min). Um zu beweisen, dass es sich dabei um das gewünschte O-Phosphat **23** handelt, wurde die Reaktion in einem größeren Maßstab durchgeführt, das gewünschte O-Phosphat **23** (siehe 8.2.10) sauber isoliert und schließlich mittels ^1H -NMR (400 MHz), ^{31}P -NMR (400 MHz) und MS (ESI $^+$) identifiziert.

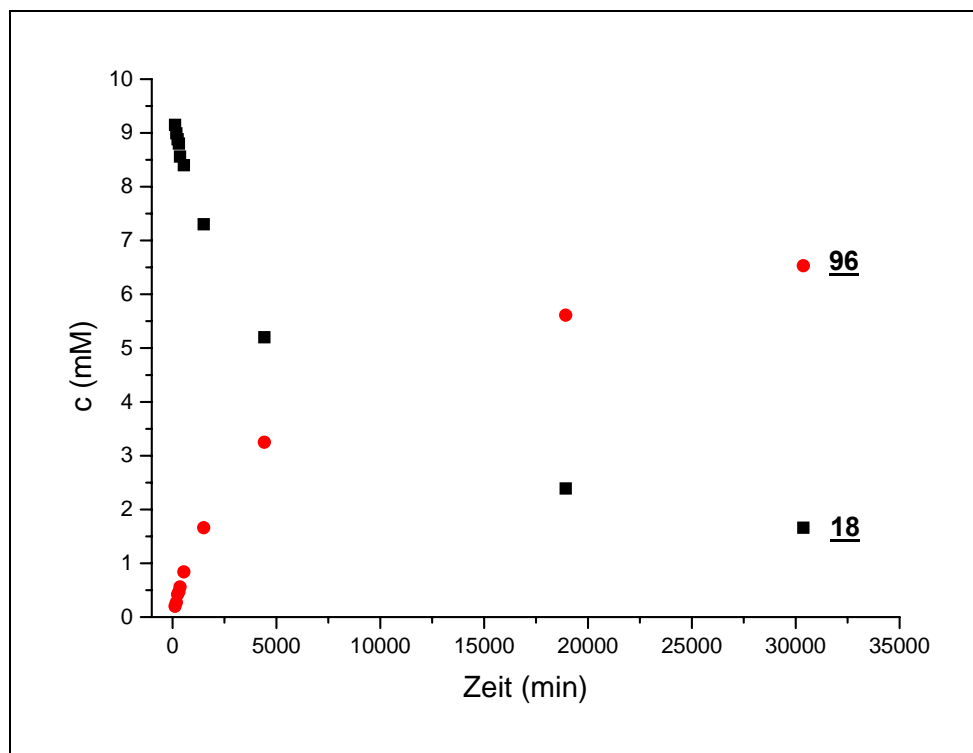


Abb. 75: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol **18** und 4-Nitrophenol **96** mit der Zeit.

Die Abbildung 75 zeigt eine gute Korrelation zwischen der Abnahme der Bis(guanidinium)naphthol **18** und der Zunahme des 4-Nitrophenols **96**. Damit entsteht auch hier nur das gewünschte O-Phosphat **23**.

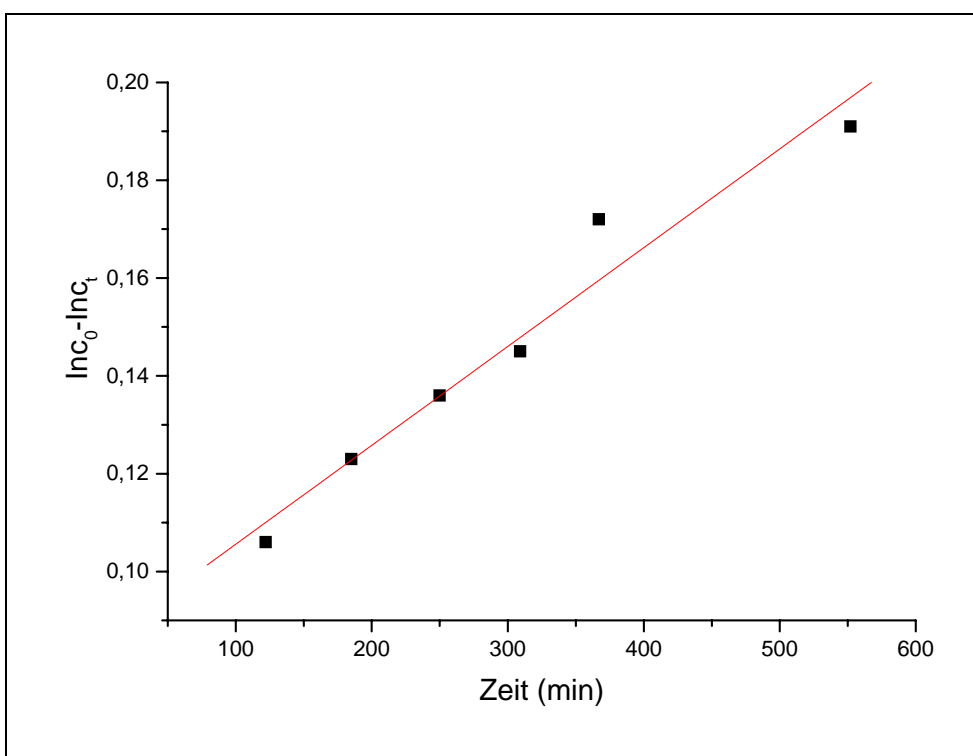


Abb. 76: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 4-BNPP **9**

Die Abbildung 76 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase bezüglich Bis(guanidinium)naphthol **18** um eine Reaktion erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 2.02 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

8.3.7.2 Reaktion in DMF/Wasser/Base

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol **18**: 22.06 mM, 4-BNPP **9**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **92**: 30 mM, DMF/H₂O (2:1) 250 mM NEt₃, pH = 11.7, 30°C. Gemessen mit Gradient A. Da sich Bis(guanidinium)naphthol **18** über längere Reaktionszeiten (Wochen) sich leicht in DMF/H₂O (2:1) zersetzt, war für die genaue Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion eine genaue Messung der Konzentration von **96** notwendig. Da sich die Peakflächen von Pikrinsäure und 4-Nitrophenol **96** überlappen können, wurde das Pikratgegenion des Bis(guanidinium)naphthols **18** gegen Chloridion ausgetauscht und außerdem wurde die Messung bei 308 nm (Absorptionsmaximum von **96** im Sauren) durchgeführt.

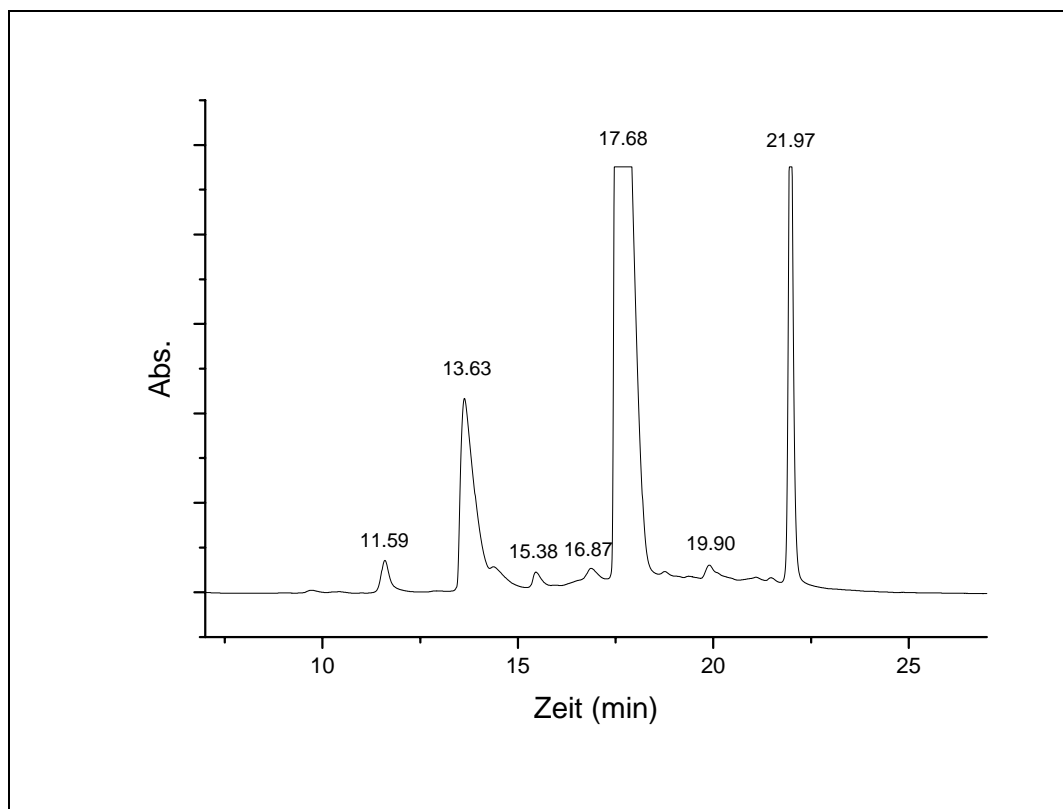


Abb. 77: Eluationsprofil nach 11 Tagen bei 308 nm.

11.59 min: 4-Nitrophenol **96**

13.63 min: Bis(guanidinium)naphthol **18**

15.38 min: Unbekannt

16.87 min: Unbekannt

17.68 min: 4-BNPP **9**

19.90 min: O-Phosphat **23**

21.97 min: 1-Nitronaphthalin **92**

Wie Abb. 77 zeigt, findet unter Berücksichtigung der Hintergrundhydrolyse von 4-BNPP **9**, auch in basischen DMF/H₂O (2:1) eine Reaktion mit **18** statt.

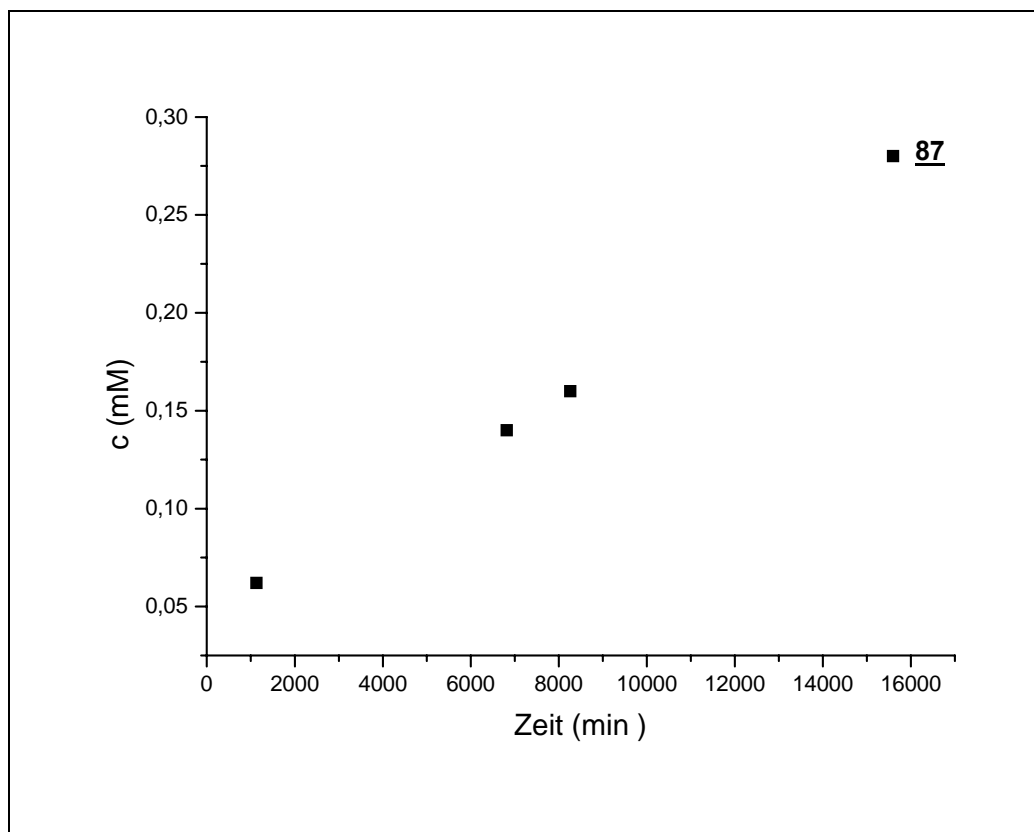


Abb. 78: Die Konzentrationsänderung von 4-Nitrophenol **96** mit der Zeit.

In Abb. 78 ist die Konzentrationsänderung von 4-Nitrophenol **96** unter Berücksichtigung der Hintergrundhydrolyse von 4-BNPP **2**, angegeben. Daraus kann man die wirkliche Konzentrationsänderung von **18**, und damit die wahre Geschwindigkeitskonstante der Reaktion berechnen.

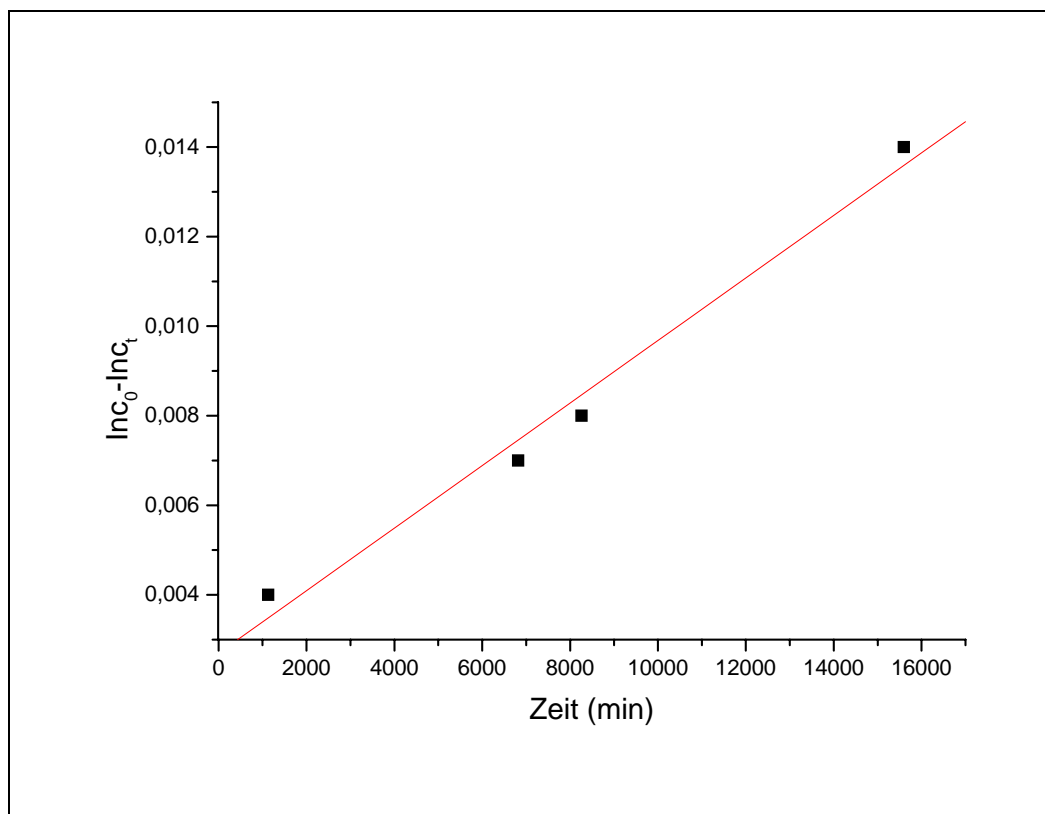


Abb. 79: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 4-BNPP **9** in DMF/H₂O (2:1) und 250 mM NEt₃.

Die Abbildung 79 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase bezüglich Bis(guanidinium)naphthol **18** um eine Reaktion erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 6.98 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$$

8.3.8 Reaktionen von Bis(guanidinium)naphthol **18** mit Phosphorsäuremethylester-4-nitrophenylester **91**, Salz mit Tetramethylguanidin in DMF/Hünig Base

Reaktionsbedingung: Bis(guanidinium)naphthol **18**: 10 mM, 4-MNPP **91**: 30 mM, 1-Nitronaphthalin **85**: 30 mM, abs. Diisopropylethylamin: 250 mM, abs. DMF, 30 °C. Gemessen mit Gradient A.

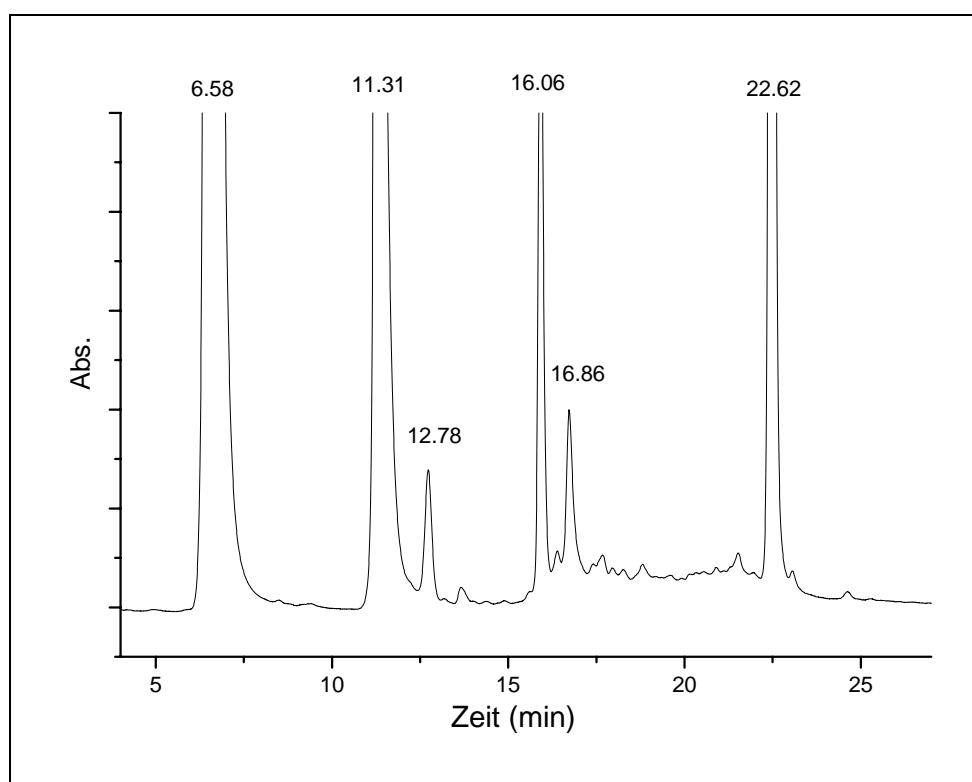
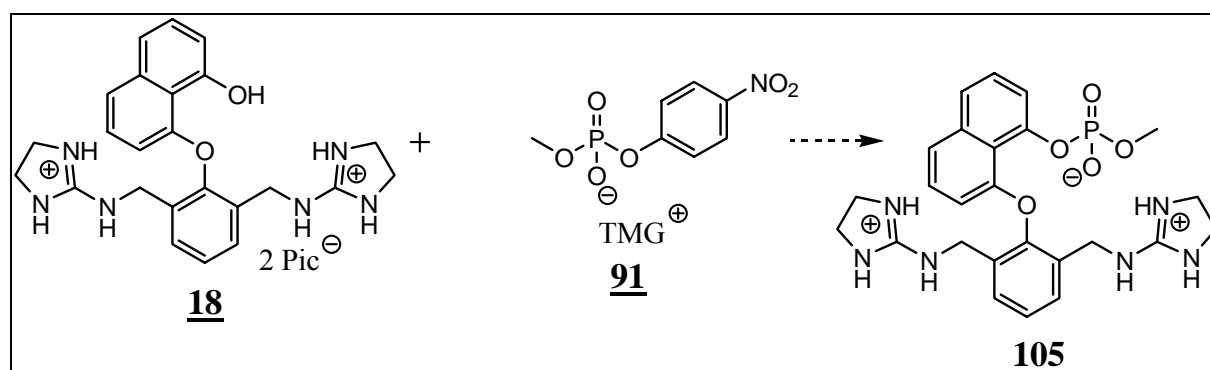


Abb. 80: Eluationsprofil nach 8 Tagen.

6.58 min : 4-MNPP **91**

11.31 min: Pikrinsäure

12.78 min: 4-Nitrophenol **96**

16.06 min: Bis(guanidiniuml)naphthol **18**

16.86 min: vermutlich O-Phosphat **105**

22.62 min: 1-Nitronaphthalin **85**

Wie Abbildung 80 zeigt, entsteht bei der Reaktion nur eine neue Verbindung (16.86 min). Eine exakte Charakterisierung dieses Produktes erfolgte nicht. Daher kann es nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser Verbindung um ein N-Phosphat handelt.

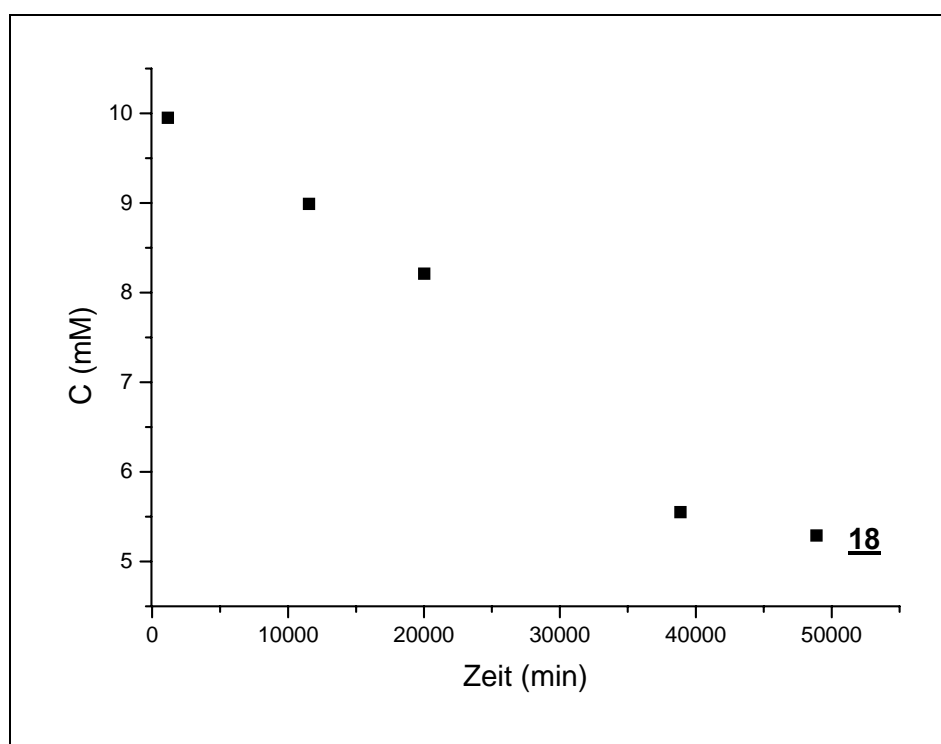


Abb. 81: Die Konzentrationsänderung von Bis(guanidinium)naphthol **18**.

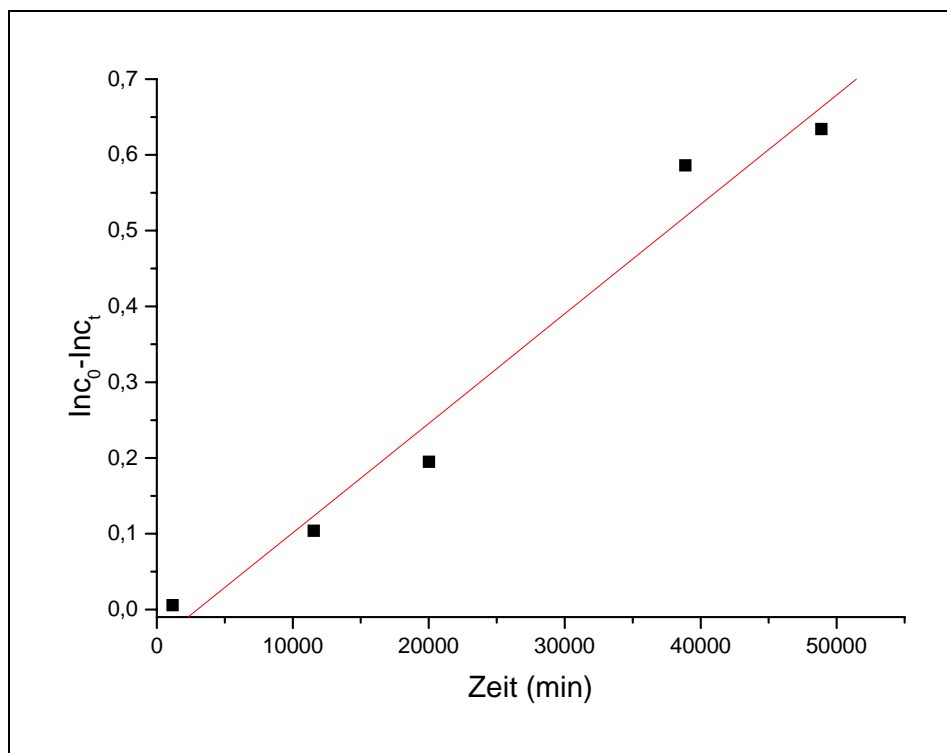


Abb. 82: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Bis(guanidinium)naphthol **18** und 4-MNPP **91**.

Die Abbildung 82 zeigt für die Anfangsphase einen linearen Zusammenhang. Damit handelt es sich für die Anfangsphase bezüglich Bis(guanidinium)naphthol **18** um eine Reaktion erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten von

$$k_{\text{obs}} = 1.44 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$$

8.4 Bestimmung der pKa-Werte von Naphtholderivate

8.4 1 Beschreibung der Methode zur Bestimmung der pKa-Werte

Die pK_a -Werte wurden mit Hilfe der UV-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurde die zu messende Substanz zunächst über eine Ionentauschersäule (Dowex 1×8, Chloridform) in die entsprechenden Chloridform überführt. Dann wurde davon eine 20 mM Lösung in H_2O hergestellt und die Probe in eine Küvette überführt. Dann wurde durch Zugabe von Phosphorsäure der pH auf 2 eingestellt und das UV-Spektrum der Substanz von 200 bis 700 nm gemessen. Danach wurde mit NaOH der pH auf 13 eingestellt und ebenfalls das UV-Spektrum von 200 bis 700nm gemessen. Dann wurden beide Spektren übereinander gelegt und eine Wellenlängen ausgesucht, bei der die Substanz im Sauren einen Maximum besaß und bei der gleichen Wellenlänge im Basischen dagegen eine Minimum. Danach wurde zur Kontrolle eine zweite Wellenlänge bestimmt, bei der diesmal umgekehrt die Substanz im Sauren einen Minimum besaß und im Basischen einen Maximum. Anschließend wurde mit der Messung begonnen, indem der pH-Wert der Substanz mit Phosphorsäure wieder auf 2 eingestellt wurde, die Probe in eine Küvette überführt, mit NaOH titriert, in kurzen Abständen die eingestellten pH-Werte gemessen und die entsprechenden Extinktionswerte bei beiden Wellenlängen bestimmt. Die Auftragung der Extinktionswerte gegen die pH-Werte ergab eine Kurve, an deren Wendepunkt der pK_a -Wert abgelesen werden konnte.

8.4 1.1 Bestimmung des pK_a -Wertes vom Bis(guanidinium)naphthol 18

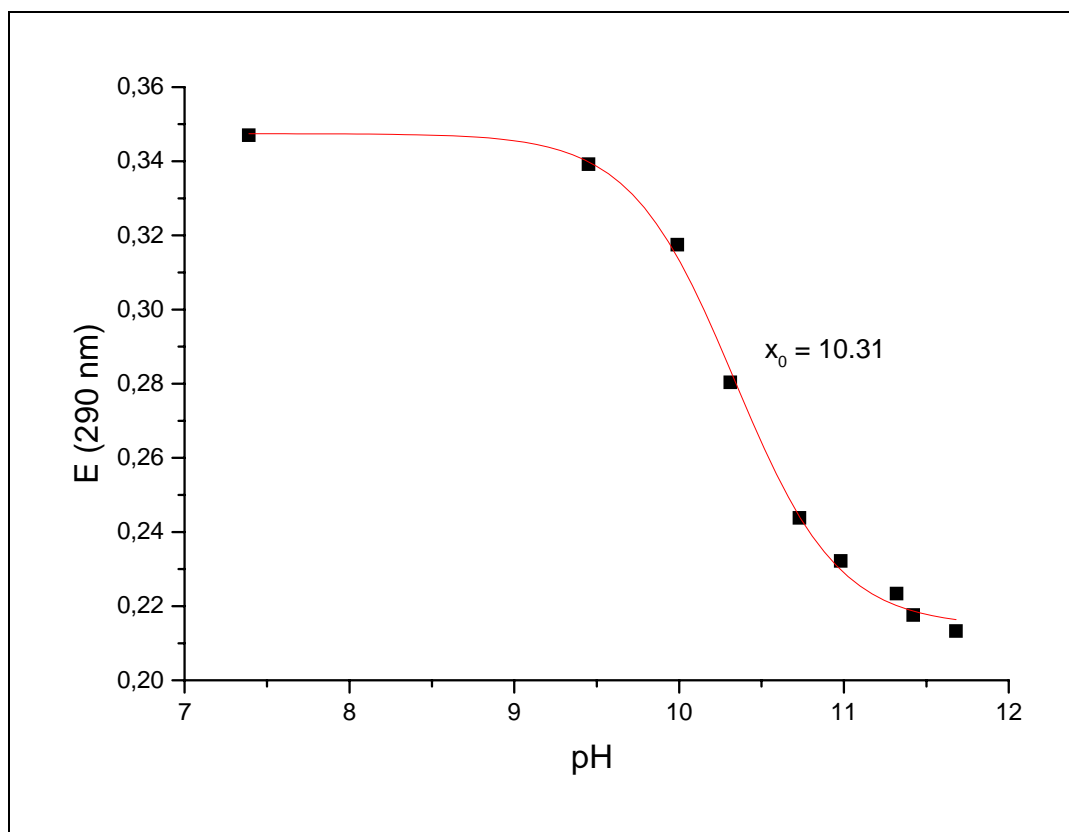
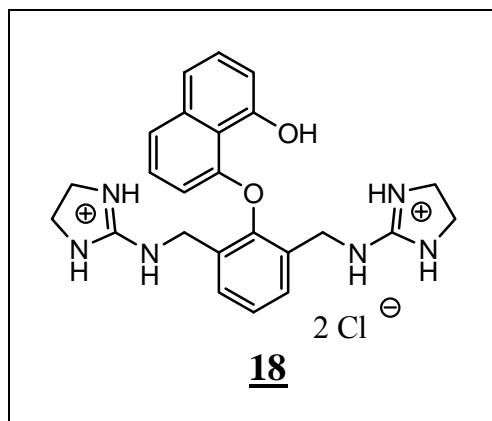


Abb. 83: Der Wendepunkt (x_0) der Kurve ergibt den pK_a -Wert von 18. Gemessen bei 290 nm.

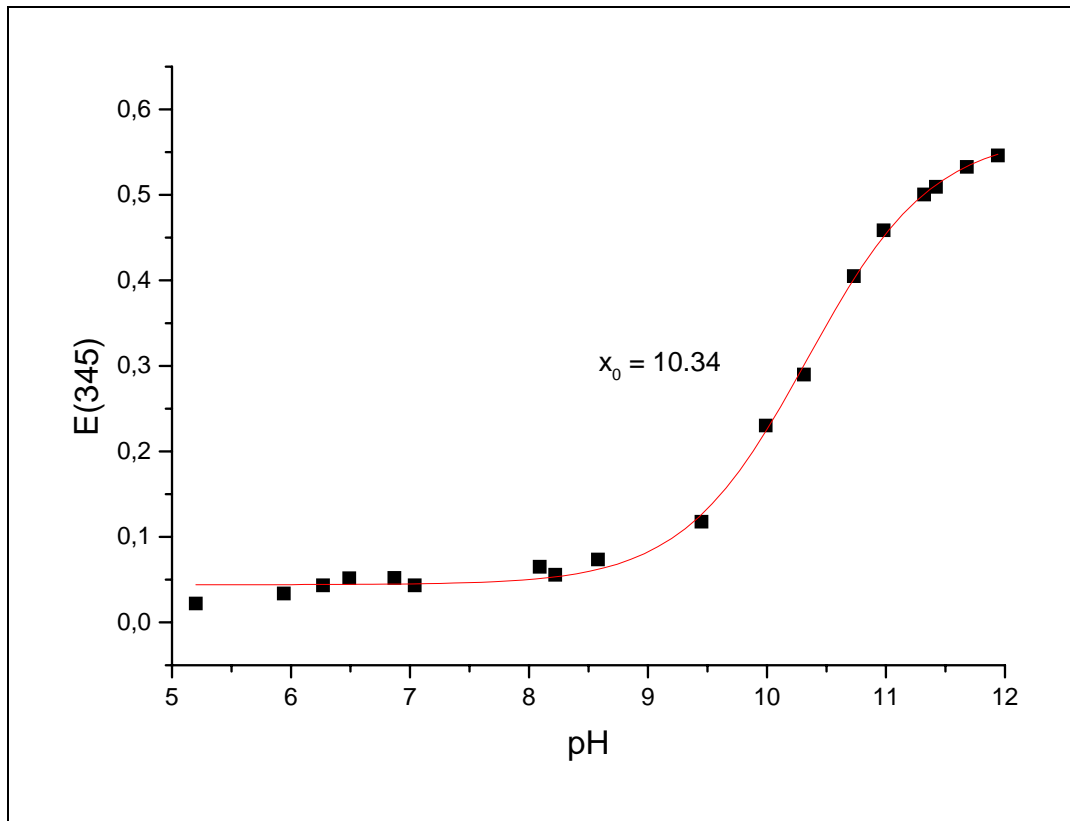


Abb. 84: Der Wendepunkt (x_0) der Kurve ergibt den pK_a -Wert von **18** Gemessen bei 345 nm.

In beiden Graphen ist der Wendepunkt der Kurven bei $x_0 = 10.3$. Das zeigt, daß die Messung ziemlich genau ist. Damit ist der pK_a -Wert des Bis(guanidinium)naphthol **18** **10.3**.

8.4 1.2 Bestimmung des pK_a -Wertes vom Bis(guanidinium)naphthol 34

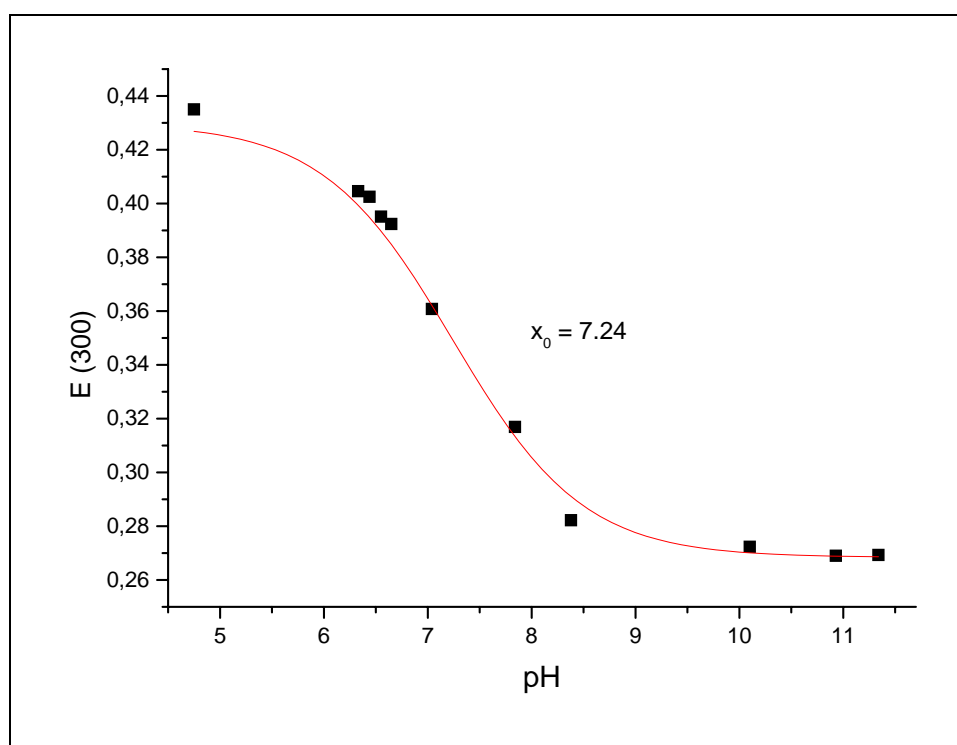
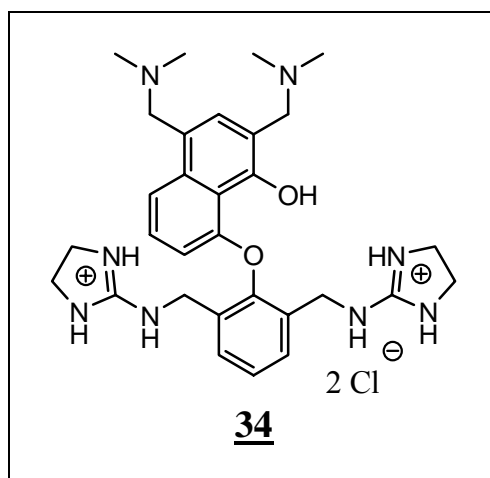


Abb. 82: Der Wendepunkt (x_0) der Kurve ergibt den pK_a -Wert von 34 Gemessen bei 300 nm.

Aus den beiden Graphen wird ein $pK_a = 7.24$ für das Bis(mannich)naphthol 34 gemessen.

8.4 1.3 Bestimmung des pK_a -Wertes vom Bis(benzimidazol)naphthol 77

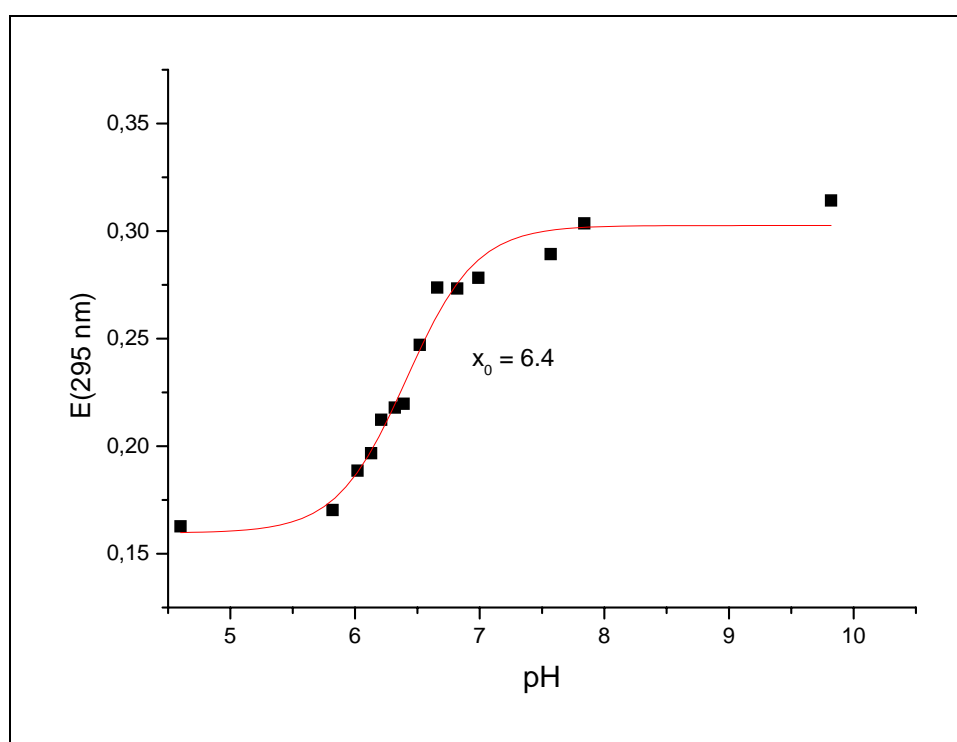
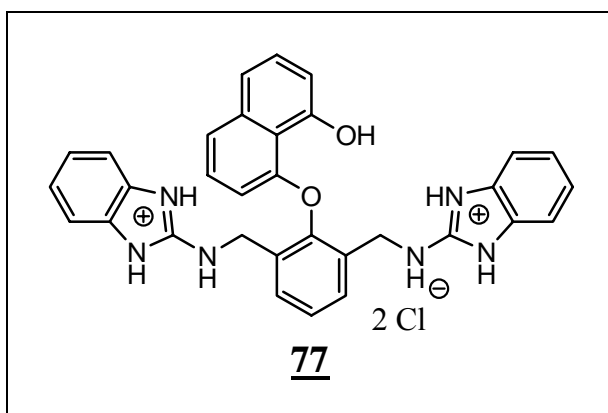


Abb. 84: Der Wendepunkt (x_0) der Kurve ergibt den pK_a -Wert von 77 Gemessen mit 295 nm Wellenlänge.

Die Messung wurde nur bei einer Wellenlänge durchgeführt, weil es keine andere Wellenlänge im UV-Spektrum existierte, bei der im Sauren das Bis(benzimidazol)naphthol 77 ein Minimum und im Basischen dagegen ein Maximum besaß. Aus dem Graphen ergibt sich damit ein $pK_a = 6.4$ für das Bis(benzimidazol)naphthol 77.

8.5 Plasmidspaltung der biskationischen Verbindungen

(Alle Experimente in diesem Kapitel wurden von Frau Dr. Ute Scheffer durchgeführt.)

8.5.1 Allgemeine Vorschrift für die Isolierung von pUC19 durch Phenolextraktion und PEG8000-Reinigung²⁸

Es wurden über Nacht zwei Kulturen von E. Coli Stamm DH α mit pUC19 in 150 ml LB-Medium/w (1 % Trypton enzymatisch hydrolysiert aus Casein, 0.5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl) und 100 μ g/ml Ampicillin, bei 37 °C angezüchtet. Bei allen Arbeiten mit DNA muss auf steriles Arbeiten geachtet werden. Dann wurde die Zellkultur für 10 min bei 4 °C mit 5000 rpm zentrifugiert, das zurückbleibende Zellpellet in 5.4 ml Lösung (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 15% Saccharose; pH 8) am Vortexer resuspendiert und die Suspension in einen SS34 Zentrifugenbecher überführt. Anschließend wurden 600 μ l Lysozyme-Lösung (20 mg/ml) zu der Suspension zugegeben und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 12 ml einer 0.2 N NaOH-Lösung (1 % SDS) zu der Suspension zugegeben und die Suspension durch Invertieren des Zentrifugenbeckers solange gemischt, bis sie klar wurde. Nach 5 minutiger Inkubation auf Eis, wurden zu der Suspension 7.5 ml einer 5 M Kalium-Acetat-Lösung (pH 5.4 und bei 4 °C gekühlt) zugegeben. Diese wurde dann solange durch Invertieren des Zentrifugenbeckers gemischt (6-8 min), bis sie homogen wurde. Daraufhin wurde die Suspension erneut für 5 min auf Eis inkubiert und Anschließend über ein feuchtes Filterpapier (Macherey & Nagel) in einem 50 ml Plastikgefäß überführt. Das Filtrat wurde dann mit 100 μ g RNase (DNase frei) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol/ (25:24:1) vom Plasmid entfernt. Daraufhin wurde die Suspension für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von Isopropyl bei gleichzeitiger Kühlung mit Eis, fiel nach etwa 60 min die plasmidische DNA aus. Diese wurde dann für 30 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert, das zurückbleibende Pellet in 0.8 ml sterilisiertem H₂O gelöst, dann 0.2 ml einer 4 M NaCl-Lösung und 1 ml einer 13 %igen PEG8000-Lösung, zugegeben. Damit wird die Plasmid DNA gefällt und kann somit von RNA und kurzem DNA Fragmenten gereinigt werden. Nach der Inkubation für 60 min, wurde die Suspension bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und das die Plasmid DNA mit 70 %igem eiskalten EtOH gewaschen. Anschließend wurde die

Suspension für 10 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert und das zurückbleibende Pellet in 150 µl Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) gelöst. Die wässrige Phase wurde danach mit 150 µl Lösung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol/ (25:24:1) versetzt und durch Zugabe von 1/10 Vol. einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 5.2)/3 Vol. EtOH, das Pellet erneut gefällt. Das ausgefallene Pellet wurde wieder in 150 µl Tris-Puffer gelöst, eine kleine Probe davon mit Ladepuffer versetzt und dann mit einem 1%igem Agarosegel analysiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

8.5.2 Allgemeine Vorschrift für die Durchführung der pUC19-Spaltung mit bisakationischen Verbindungen

Zunächst wurde aus dem zu untersuchenden Katalysator mit sterilisiertem H₂O 10 µl einer 20 mM Stammlösung hergestellt und bei -20°C gelagert. Diese Stammlösung wurde dann für die Messungen so verdünnt, daß man Lösungen mit Konzentrationen von 0.1 bis 10 mM erhält. Davon wurden dann jeweils soviel entnommen und zu 20 mM HEPES-Puffer (pH 7 mit NaOH eingestellt) und 100 ng/µl pUC19 (Stammlösung: 1 µg/µl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) gegeben, bis die Lösung am Ende ein Gesamtvolumen von 10 µl enthielt. Danach wurde die Lösung für 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben jeweils mit 3 µl Ladepuffer versetzt, dann damit ein 1%iges Agarosegel beladen und die Plasmidbanden mit der Gelelektrophorese voneinander getrennt. Analysiert wurden die Plasmidbanden mit Hilfe einer Digitalkamera. Dabei werden die Peakflächen der Form I, II und III miteinander addiert und daraus die Peakflächen der einzelnen Formen berechnet. Da das Ethidiumbromid mit den Form II und III besser intercaliert, als mit den Form I, wurden die Peakflächen vom Form I vorher mit dem Korrekturfaktor 1.22 multipliziert.

8.5.3 Allgemeine Vorschrift für die Isolierung von Form II der plasmidischen DNA

Zunächst wurde aus der Stammlösung des zu untersuchenden Katalysators soviel entnommen und zu 20 mM HEPES-Puffer (pH 7 mit NaOH eingestellt) und 100 ng/μl pUC19 (Stammlösung: 1 μg/μl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) gegeben, bis die Lösung am Ende ein Gesamtvolumen von 200 μl enthielt. Danach wurde die Lösung für 24 h bei 37 °C inkubiert. Um Anschließend den Katalysator aus der Suspension zu entfernen, wurden zu der Suspension 50 μl DOWEX resin (Na⁺-Form) zugegeben, die Suspension bei RT für 10 min inkubiert, dann für 5 min mit 20000 rpm zentrifugiert und Anschließend die wässrige Phase über eine Freeze und Squeeze spin Säule abfiltriert. Nach Zugabe von 1/10 Vol einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 5.2)/3 Vol EtOH zu der wässrigen Phase wurde die DNA gefällt. Diese wurde dann in 15 μl einer 10 mM Tris-Puffer (pH 8.0) gelöst, 10 μl Ladepuffer zugegeben und damit ein 1 %iges Agarosegel beladen. Auch hier wurden die Plasmidbanden nach der Vorschrift 8.5.2 analysiert. Isoliert wurde die Form II mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) und quantifiziert mit der Etidiumbromid-Methode.

8.5.4 Allgemeine Vorschrift für die Plasmidspaltung durch EcoR1 in Anwesenheit von Ethidiumbromid²⁹

Der 10 × Inkubationspuffer H (1 M Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ und 0.25 % Triton X-100) und das pUC19 (Stammlösung: 1 μg/μl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) wurden aufgetaut und sofort im Vortexer resuspendiert. In einen Eppendorfgefäß wurden zu 20 μg pUC19 soviel sterilisiertes H₂O zugegeben, bis die Lösung ein Volumen von 108 μl erreichte. Dazu wurden dann 20 μl 10 × Inkubationspuffer H, 2 μl acetylierte BSA-Lösung (10 μg/μl) und 50 μl Etbr (60 pg/μl) und 20 μl EcoR1 (20 U/μl in dem Lagepuffer: 10 mM KPO₄, pH 7.5) zugegeben. Die Lösung wurde dann gründlich gemischt und sofort zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Für die Verdauung wurde die Probe für 16-20 h bei 37 °C inkubiert. Um anschließend das Etbr aus der Probe zu entfernen,

wurden sie zuerst 50 µl Dowex resin (Na⁺-Form), dann bei RT für 10 min inkubiert und am Ende für 5 min mit voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase über eine Freeze und Squeeze spin Säule abfiltriert und durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaOAc(pH 5.2)/3 Vol. EtOH die plasmidische DNA ausgefällt. Diese wurde dann in 20 µl sterilisiertem H₂O gelöst, 5 µl Ladepuffer zugegeben und damit ein 1%iges Agarosegel beladen. Auch hier wurden die Plasmidbanden nach der Vorschrift 8.5.2 analysiert. Danach wurde die Form II aus dem Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits isoliert und mit der Ethidiumbromid-Methode quantifiziert.

8.5.5 Allgemeine Vorschrift für die Ligation von Form II mit T4 DNA-Ligase in Anwesenheit von Ethidiumbromid

Der 10 × Inkubationspuffer H (1 M Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ und 0.25% Triton X-100) und die Form II (Stammlösung: 1 µg/µl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) wurden aufgetaut und sofort im Vortexer suspendiert. In einem Eppendorfgefäß wurden zu 0.5 µg Form II soviel sterilisiertes H₂O zugegeben, bis die Lösung ein Volumen von 50 µl erreichte. Dazu wurden 10 µl eines 10 × Inkubationspuffer H, 1.5 µl Etbr-Lösung (60 pg/µl) und 3 µl verdünnte T4 DNA-Ligase (in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 200 µg/ml BSA, 50% Glycerin, pH 7.4) zugegeben. Die Lösung wurde dann gründlich gemischt und sofort zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Eppendorfgefäß zu sammeln. Die Lösung wurde anschließend im Wasserbad (Thermostat, Lauda) für 16 h bei 16 °C inkubiert. Wie in der Vorschrift 8.5.2 wurde dann die Probe auf einem Agarosegel aufgetragen und dann analysiert.

9 Anhang

9.1 Daten zur Kristallstruktur von 19:

Kristallsystem: triklin; Raumgruppe P-1; Zelldimension: $a = 10.344 (3) \text{ \AA}$, $b = 11.479 (5) \text{ \AA}$, $c = 14.960 (9) \text{ \AA}$, $\alpha = 79.08 (5)^\circ$, $\beta = 70.99 (4)^\circ$, $\gamma = 88.60 (7)^\circ$; $V = 1647.8 (13) \text{ \AA}^3$, $z = 2$; $\rho_{\text{ber}} = 1.585 \text{ Mg/m}^3$, Siemens Smart Diffraktometer; linearer Absorptionskoeffizient $\mu = 0.133 \text{ mm}^{-1}$; $T = 141 (2) \text{ K}$; Kristall Dimension $0.60 \times 0.45 \times 0.4 \text{ mm}$; $F(000) = 814$; Limiting indices: $-13 \leq h \leq 13$, $-14 \leq k \leq 14$, $-19 \leq l \leq 19$; Reflexe gemessen: 14284, davon 6915 unabhängig, gleiche Reflexe wurden gemittelt ($R_{\text{int}} = 0.1739$); Completeness to Data = 27.94, 87%, Absorptionskorrektur: keine; Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]: $R1 = 0.1226$, $wR2 = 0.2164$; R indices (all data): $R1 = 0.2346$, $wR2 = 0.2723$; goodness of fit = 1.155; Theta Bereich für Datenfassung: $1.47\text{--}32.32^\circ$; Restelektronendichte: 0.401 und $-0.374 \text{ e/\AA}^{-3}$.

Zur Kristallstruktur wurde ein Kristall der Dimension $0.60 \times 0.45 \times 0.4 \text{ mm}$ mit einem Siemens Smart Diffraktometer ohne Absorptionskorrektur bei 132° C vermessen.

Tabelle 18: Wasserstoffbrücken:

D - H ... O	D - H	H...O	D...O	D-H-O	Symmetrie
	[\AA]	[\AA]	[\AA]	[deg]	
O17 - H017A ... O3	1.10	1.58	2.676	173	x, y, z
O17 - H017B ... O10	0.92	1.95	2.785	151	x, y+1, z
O17 - H017B ... O11	0.92	2.12	2.748	124	x, y+1, z
O2 - H02 ... O17	0.96	1.80	2.755	174	1-x, 1-y, 2-z
N1 - H1A ... O12	0.91	2.39	3.156	141	1-x, -y, 2-z
N1 - H1B ... O1	0.91	2.25	2.851	123	x, y, z
N1 - H1B ... O2	0.91	2.13	2.996	158	x, y, z
N1 - H1C ... O17	0.91	1.90	2.806	176	x+1, y-1, z
N2 - H2A ... O10	0.91	1.90	2.783	164	x, y, z
N2 - H2B ... O18	0.91	2.13	2.793	129	x, y, z
N2 - H2C ... O3	0.91	2.08	2.840	141	x, y-1, z
N2 - H2C ... O4	0.91	2.29	3.066	143	x, y-1, z

N2' - H2'A	... O10	0.91	2.05	2.909	158	x, y-1, z
N2' - H2'C	... O9	0.91	2.06	2.954	166	1-x, 1-y, 1-z

Tabelle 19: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

	X	Y	Z	U(eq)
<hr/>				
O(10)	2572(4)	1524(4)	7861(3)	31(1)
O(9)	4136(5)	8826(4)	5594(3)	42(1)
O(3)	3821(5)	8453(4)	7511(3)	32(1)
O(2)	8434(5)	1313(4)	9059(4)	37(1)
O(17)	2027(5)	9249(4)	8986(4)	36(1)
O(1)	8203(5)	960(4)	7465(3)	33(1)
O(15)	2545(6)	3958(5)	5455(4)	55(2)
N(7)	970(5)	6160(5)	8102(5)	32(1)
O(7)	5196(5)	3584(4)	6231(5)	52(2)
N(8)	2426(6)	3150(5)	6143(4)	32(1)
N(3)	5025(6)	6980(5)	8811(4)	39(2)
O(13)	779(5)	6482(4)	8877(4)	46(1)
O(5)	5137(6)	6231(5)	9470(4)	53(2)
O(6)	5342(5)	3170(4)	7677(4)	51(2)
O(14)	835(5)	6818(4)	7390(4)	43(1)
O(12)	2026(5)	2704(4)	10297(4)	44(1)
N(1)	9928(6)	-672(5)	8172(4)	37(1)
C(12)	9463(6)	-502(5)	6643(4)	23(1)
N(6)	1771(6)	2268(5)	9683(4)	34(1)
O(11)	1409(6)	1223(4)	9812(4)	54(2)
N(5)	3789(6)	7767(5)	5810(4)	35(1)
C(17)	10529(7)	-359(6)	7099(5)	30(2)
C(18)	6000(13)	753(11)	6589(10)	22(3)
N(2)	5117(10)	540(8)	7638(7)	25(3)
C(18')	5959(16)	720(14)	6982(13)	29(4)
N(2')	4921(11)	613(10)	6534(8)	24(3)

C(1)	8442(6)	2175(5)	7086(5)	24(1)
C(13)	9548(6)	-1347(5)	6082(5)	27(2)
C(9)	8736(7)	3876(6)	5822(5)	37(2)
C(19)	4270(6)	7451(5)	7350(4)	25(1)
O(4)	5154(8)	8038(5)	8795(5)	84(2)
C(30)	2065(6)	3442(5)	7094(5)	25(1)
C(16)	7218(6)	5(5)	6505(5)	29(2)
C(7)	8338(6)	4155(5)	7449(5)	27(2)
O(16)	2640(7)	2126(5)	6044(4)	68(2)
C(26)	1797(6)	3034(5)	8791(5)	26(2)
N(4)	5195(5)	3865(5)	6985(6)	42(2)
C(11)	8311(6)	175(5)	6831(4)	25(1)
C(2)	8352(6)	2905(5)	7778(5)	25(1)
C(10)	8665(6)	2629(6)	6144(5)	32(2)
C(3)	8258(6)	2501(6)	8758(5)	30(2)
C(25)	2166(6)	2556(5)	7917(4)	24(1)
C(28)	1367(6)	4953(6)	8032(5)	28(2)
C(15)	7353(7)	-823(5)	5920(5)	32(2)
C(22)	4956(6)	5096(5)	7087(5)	33(2)
C(5)	7896(7)	4493(6)	9061(6)	38(2)
C(8)	8545(6)	4616(6)	6475(5)	35(2)
C(6)	8104(6)	4919(6)	8111(6)	35(2)
C(21)	5050(6)	5455(6)	7889(5)	33(2)
O(8)	3060(6)	7322(5)	5439(4)	52(2)
C(14)	8501(7)	-1498(6)	5706(5)	32(2)
C(23)	4560(6)	5863(6)	6396(5)	31(2)
C(27)	1434(6)	4179(5)	8851(5)	29(2)
C(20)	4778(6)	6616(5)	8006(5)	28(2)
C(24)	4239(6)	6998(5)	6536(5)	26(2)
C(4)	8022(7)	3269(6)	9379(5)	36(2)
C(29)	1673(6)	4583(6)	7157(5)	30(2)
O(18)	4876(13)	1067(11)	9431(8)	91(5)
C(31)	5410(20)	-10(20)	9782(17)	106(8)

Tabelle 20: Atomabstände [\AA°] von **19**.

Atome	Atomabstände [\AA°]
O(10)-C(25)	1.256(7)
O(9)-N(5)	1.228(7)
O(3)-C(19)	1.266(7)
O(2)-C(3)	1.380(7)
O(1)-C(1)	1.398(7)
O(1)-C(11)	1.405(7)
O(15)-N(8)	1.223(7)
N(7)-O(14)	1.228(7)
N(7)-O(13)	1.237(7)
N(7)-C(28)	1.449(8)
O(7)-N(4)	1.229(8)
N(8)-O(16)	1.219(7)
N(8)-C(30)	1.450(8)
N(3)-O(5)	1.214(7)
N(3)-O(4)	1.220(8)
N(3)-C(20)	1.446(8)
O(6)-N(4)	1.232(8)
O(12)-N(6)	1.226(7)
N(1)-C(17)	1.495(8)
C(12)-C(13)	1.382(8)
C(12)-C(11)	1.386(8)
C(12)-C(17)	1.499(9)
N(6)-O(11)	1.226(7)
N(6)-C(26)	1.445(8)
N(5)-O(8)	1.239(7)
N(5)-C(24)	1.456(8)
C(18)-C(16)	1.492(13)
C(18)-N(2)	1.513(16)
C(18')-N(2')	1.458(19)
C(18')-C(16)	1.563(16)
C(1)-C(10)	1.352(9)

C(1)-C(2)	1.429(8)
C(13)-C(14)	1.401(9)
C(9)-C(8)	1.376(10)
C(9)-C(10)	1.416(9)
C(19)-C(24)	1.422(9)
C(19)-C(20)	1.453(9)
C(30)-C(29)	1.373(8)
C(30)-C(25)	1.472(9)
C(16)-C(15)	1.385(9)
C(16)-C(11)	1.400(9)
C(7)-C(8)	1.400(9)
C(7)-C(6)	1.404(9)
C(7)-C(2)	1.428(8)
C(26)-C(27)	1.369(8)
C(26)-C(25)	1.446(9)
N(4)-C(22)	1.456(8)
C(2)-C(3)	1.423(9)
C(3)-C(4)	1.361(9)
C(28)-C(29)	1.388(9)
C(28)-C(27)	1.392(9)
C(15)-C(14)	1.384(9)
C(22)-C(21)	1.373(9)
C(22)-C(23)	1.388(10)
C(5)-C(6)	1.359(10)
C(5)-C(4)	1.412(10)
C(21)-C(20)	1.387(8)
C(23)-C(24)	1.374(8)
O(18)-C(31)	1.42(3)
C(1)-O(1)-C(11)	118.7(5)
O(14)-N(7)-O(13)	122.9(6)
O(14)-N(7)-C(28)	118.6(6)
O(13)-N(7)-C(28)	118.4(6)
O(16)-N(8)-O(15)	121.8(6)
O(16)-N(8)-C(30)	119.9(6)
O(15)-N(8)-C(30)	118.2(5)

O(5)-N(3)-O(4)	121.8(6)
O(5)-N(3)-C(20)	119.5(6)
O(4)-N(3)-C(20)	118.7(6)
C(13)-C(12)-C(11)	118.3(6)
C(13)-C(12)-C(17)	121.8(5)
C(11)-C(12)-C(17)	119.8(5)
O(12)-N(6)-O(11)	123.1(6)
O(12)-N(6)-C(26)	118.8(6)
O(11)-N(6)-C(26)	118.0(6)
O(9)-N(5)-O(8)	122.6(6)
O(9)-N(5)-C(24)	119.1(6)
O(8)-N(5)-C(24)	118.3(6)
N(1)-C(17)-C(12)	110.4(5)
C(16)-C(18)-N(2)	107.9(9)
N(2')-C(18')-C(16)	108.3(12)
C(10)-C(1)-O(1)	122.3(5)
C(10)-C(1)-C(2)	122.6(6)
O(1)-C(1)-C(2)	115.0(6)
C(12)-C(13)-C(14)	120.4(6)
C(8)-C(9)-C(10)	119.7(7)
O(3)-C(19)-C(24)	122.9(6)
O(3)-C(19)-C(20)	123.8(6)
C(24)-C(19)-C(20)	113.2(5)
C(29)-C(30)-N(8)	115.9(6)
C(29)-C(30)-C(25)	123.6(6)
N(8)-C(30)-C(25)	120.5(5)
C(15)-C(16)-C(11)	117.7(6)
C(15)-C(16)-C(18)	114.8(8)
C(11)-C(16)-C(18)	126.7(7)
C(15)-C(16)-C(18')	130.8(8)
C(11)-C(16)-C(18')	111.1(8)
C(18)-C(16)-C(18')	21.4(7)
C(8)-C(7)-C(6)	120.2(6)
C(8)-C(7)-C(2)	120.3(6)
C(6)-C(7)-C(2)	119.5(6)

C(27)-C(26)-N(6)	115.9(6)
C(27)-C(26)-C(25)	124.8(6)
N(6)-C(26)-C(25)	119.3(5)
O(7)-N(4)-O(6)	124.6(6)
O(7)-N(4)-C(22)	118.2(7)
O(6)-N(4)-C(22)	117.1(7)
C(12)-C(11)-C(16)	122.6(5)
C(12)-C(11)-O(1)	116.9(5)
C(16)-C(11)-O(1)	120.1(5)
C(3)-C(2)-C(7)	117.5(5)
C(3)-C(2)-C(1)	126.2(6)
C(7)-C(2)-C(1)	116.3(6)
C(1)-C(10)-C(9)	119.8(6)
C(4)-C(3)-O(2)	120.8(6)
C(4)-C(3)-C(2)	120.9(6)
O(2)-C(3)-C(2)	118.3(5)
O(10)-C(25)-C(26)	124.0(6)
O(10)-C(25)-C(30)	124.1(6)
C(26)-C(25)-C(30)	111.8(5)
C(29)-C(28)-C(27)	121.0(6)
C(29)-C(28)-N(7)	120.0(6)
C(27)-C(28)-N(7)	119.0(6)
C(14)-C(15)-C(16)	120.9(6)
C(21)-C(22)-C(23)	121.4(6)
C(21)-C(22)-N(4)	119.5(7)
C(23)-C(22)-N(4)	119.0(7)
C(6)-C(5)-C(4)	119.5(6)
C(9)-C(8)-C(7)	120.9(6)
C(5)-C(6)-C(7)	121.3(6)
C(22)-C(21)-C(20)	119.7(6)
C(15)-C(14)-C(13)	119.9(6)
C(24)-C(23)-C(22)	118.5(6)
C(26)-C(27)-C(28)	119.2(6)
C(21)-C(20)-N(3)	117.4(6)
C(21)-C(20)-C(19)	122.3(6)

N(3)–C(20)–C(19)	120.4(5)
C(23)–C(24)–C(19)	124.6(6)
C(23)–C(24)–N(5)	116.9(6)
C(19)–C(24)–N(5)	118.4(5)
C(3)–C(4)–C(5)	120.8(7)
C(30)–C(29)–C(28)	119.6(6)

Tabelle 21: Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O(10)	32(3)	19(2)	48(3)	–12(2)	–18(2)	11(2)
O(9)	57(3)	23(3)	50(3)	–2(2)	–26(3)	–2(2)
O(3)	39(3)	14(2)	40(3)	–7(2)	–9(2)	9(2)
O(2)	55(3)	23(3)	31(3)	–7(2)	–12(2)	13(2)
O(17)	53(3)	14(2)	42(3)	–8(2)	–14(2)	7(2)
O(1)	41(3)	16(2)	41(3)	–12(2)	–12(2)	11(2)
O(15)	81(4)	38(3)	41(3)	–6(3)	–17(3)	18(3)
N(7)	24(3)	16(3)	51(4)	–7(3)	–8(3)	5(2)
O(7)	31(3)	36(3)	101(5)	–40(3)	–22(3)	12(2)
N(8)	37(3)	15(3)	51(4)	–6(3)	–23(3)	3(2)
N(3)	44(4)	29(3)	49(4)	–9(3)	–21(3)	12(3)
O(13)	59(3)	24(3)	61(4)	–22(3)	–20(3)	17(2)
O(5)	64(4)	38(3)	57(4)	4(3)	–29(3)	15(3)
O(6)	32(3)	19(3)	101(5)	–6(3)	–25(3)	5(2)
O(14)	51(3)	15(2)	63(4)	3(2)	–24(3)	8(2)
O(12)	61(4)	36(3)	46(3)	–15(2)	–30(3)	17(2)
N(1)	53(4)	23(3)	38(4)	–7(3)	–20(3)	14(3)
C(12)	23(3)	20(3)	26(4)	–8(3)	–7(3)	7(3)
N(6)	42(3)	19(3)	40(4)	–7(3)	–13(3)	15(2)
O(11)	97(5)	18(3)	42(3)	–7(2)	–16(3)	11(3)
N(5)	39(3)	30(3)	36(4)	–7(3)	–13(3)	4(3)
C(17)	33(4)	24(3)	36(4)	–6(3)	–15(3)	6(3)
C(1)	14(3)	14(3)	38(4)	–7(3)	–1(3)	5(2)

C(13)	22(3)	23(3)	35(4)	-7(3)	-6(3)	11(3)
C(9)	29(4)	32(4)	45(5)	5(3)	-11(3)	3(3)
C(19)	23(3)	16(3)	33(4)	-6(3)	-5(3)	4(3)
O(4)	168(7)	32(3)	93(5)	-22(3)	-94(5)	20(4)
C(30)	20(3)	18(3)	40(4)	-10(3)	-12(3)	3(2)
C(16)	25(3)	16(3)	38(4)	0(3)	-4(3)	9(3)
C(7)	19(3)	20(3)	40(4)	-2(3)	-9(3)	-5(3)
O(16)	132(6)	25(3)	62(4)	-14(3)	-51(4)	7(3)
C(26)	19(3)	22(3)	33(4)	-3(3)	-4(3)	4(3)
N(4)	18(3)	17(3)	90(5)	-22(4)	-12(3)	7(2)
C(11)	26(3)	16(3)	25(4)	-5(3)	2(3)	1(3)
C(2)	15(3)	22(3)	38(4)	-9(3)	-6(3)	2(2)
C(10)	22(3)	29(4)	35(4)	-2(3)	1(3)	3(3)
C(3)	26(3)	20(3)	38(4)	-8(3)	-4(3)	9(3)
C(25)	13(3)	25(3)	33(4)	-5(3)	-6(3)	0(2)
C(28)	16(3)	22(3)	42(4)	-3(3)	-7(3)	4(3)
C(15)	26(4)	17(3)	54(5)	-6(3)	-16(3)	6(3)
C(22)	19(3)	16(3)	58(5)	-10(3)	-4(3)	4(3)
C(5)	27(4)	33(4)	62(6)	-26(4)	-16(4)	8(3)
C(8)	24(4)	17(3)	61(5)	-4(3)	-11(3)	-1(3)
C(6)	24(4)	14(3)	73(6)	-15(3)	-21(4)	6(3)
C(21)	18(3)	19(3)	58(5)	0(3)	-11(3)	8(3)
O(8)	70(4)	45(3)	54(4)	-11(3)	-35(3)	-6(3)
C(14)	41(4)	20(3)	44(4)	-15(3)	-22(3)	13(3)
C(23)	20(3)	25(4)	46(4)	-17(3)	-1(3)	-4(3)
C(27)	27(4)	20(3)	45(4)	-10(3)	-14(3)	6(3)
C(20)	21(3)	22(3)	44(4)	-9(3)	-11(3)	5(3)
C(24)	14(3)	21(3)	42(4)	-7(3)	-6(3)	4(3)
C(4)	32(4)	33(4)	51(5)	-15(3)	-21(3)	12(3)
C(29)	23(3)	21(3)	45(4)	-2(3)	-14(3)	2(3)

Tabelle 22: Wasserstoffkoordinaten und isotropic displacement parameters.

	X	Y	Z	U(eg)
H(1A)	9515	-1409	8347	56
H(1B)	9299	-133	8386	56
H(1C)	10604	-664	8437	56
H(17A)	11294	-881	6872	36
H(17B)	10896	472	6904	36
H(18A)	5478	535	6191	27
H(18B)	6294	1602	6359	27
H(2A)	4367	990	7707	38
H(2B)	5606	742	7997	38
H(2C)	4847	-241	7841	38
H(18C)	5587	400	7683	34
H(18D)	6238	1565	6888	34
H(2'A)	4182	1031	6799	37
H(2'B)	4661	-165	6631	37
H(2'C)	5272	907	5890	37
H(13A)	10323	-1828	5950	33
H(9A)	8914	4200	5158	45
H(10A)	8774	2114	5699	38
H(15A)	6647	-928	5662	38
H(5A)	7667	5014	9508	46
H(8A)	8554	5450	6261	42
H(6A)	8092	5751	7890	42
H(21A)	5300	4911	8363	40
H(14A)	8578	-2064	5305	38
H(23A)	4511	5609	5839	38
H(27A)	1231	4442	9445	35
H(4A)	7941	2979	10034	43
H(29A)	1611	5117	6605	36
H(02)	8210(70)	1140(60)	9750(50)	40(20)
H(017)	2140(80)	10060(80)	8820(50)	60(20)
H(017)	2820(130)	8910(120)	8410(80)	140(50)

Tabelle 23: Bindungswinkel

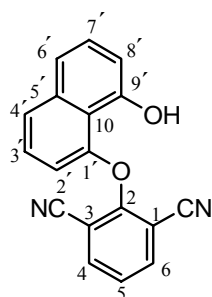
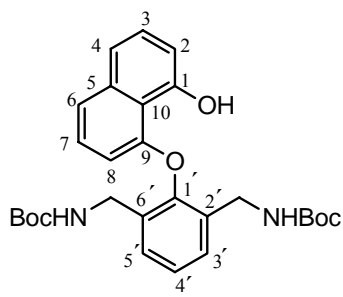
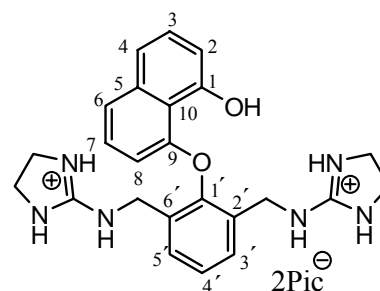
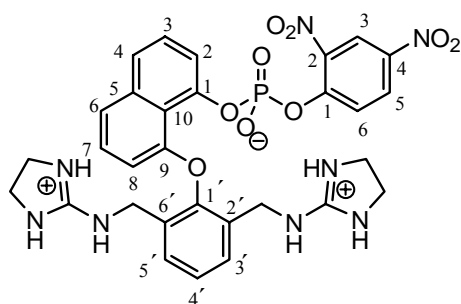
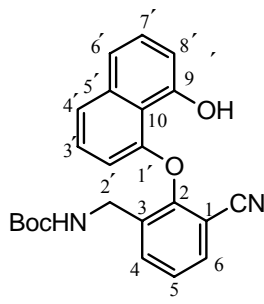
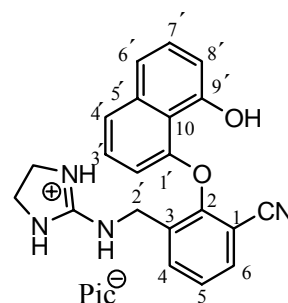
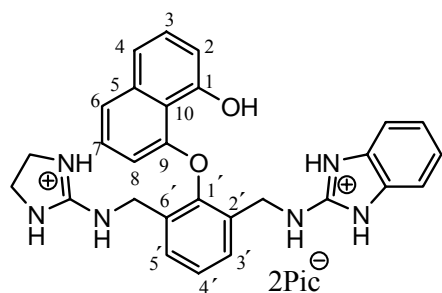
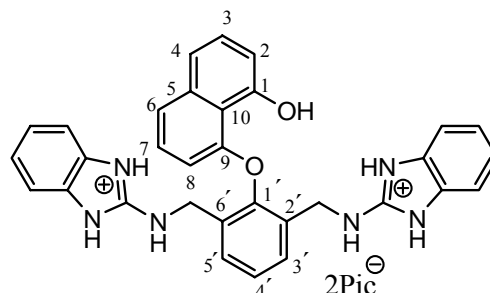
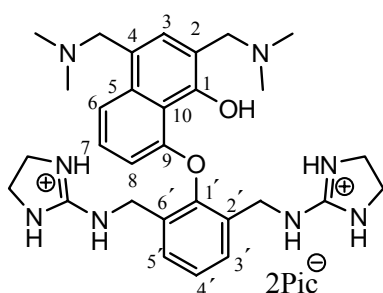
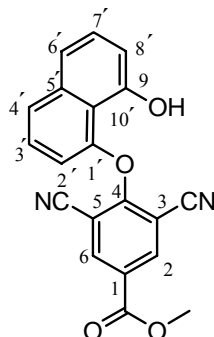
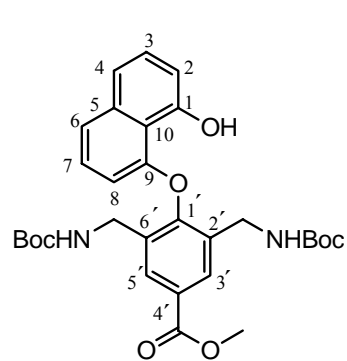
Atome	Bindungswinkel [°]
C(11)-C(12)-C(17)-N(1)	61.4(7)
C(11)-O(1)-C(1)-C(10)	5.3(8)
C(11)-O(1)-C(1)-C(2)	-178.2(5)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	0.8(9)
C(17)-C(12)-C(13)-C(14)	176.7(6)
O(16)-N(8)-C(30)-C(29)	-171.9(6)
O(15)-N(8)-C(30)-C(29)	10.1(8)
O(16)-N(8)-C(30)-C(25)	9.7(9)
O(15)-N(8)-C(30)-C(25)	-168.2(6)
N(2)-C(18)-C(16)-C(15)	119.4(9)
N(2)-C(18)-C(16)-C(11)	-70.9(11)
N(2)-C(18)-C(16)-C(18')	-23(2)
N(2')-C(18')-C(16)-C(15)	-13.7(17)
N(2')-C(18')-C(16)-C(11)	173.6(9)
N(2')-C(18')-C(16)-C(18)	33.2(19)
O(12)-N(6)-C(26)-C(27)	-31.2(8)
O(11)-N(6)-C(26)-C(27)	144.3(6)
O(12)-N(6)-C(26)-C(25)	150.0(6)
O(11)-N(6)-C(26)-C(25)	-34.5(8)
C(13)-C(12)-C(11)-C(16)	2.4(9)
C(17)-C(12)-C(11)-C(16)	-173.6(6)
C(13)-C(12)-C(11)-O(1)	175.1(5)
C(17)-C(12)-C(11)-O(1)	-0.9(8)
C(15)-C(16)-C(11)-C(12)	-4.4(9)
C(18)-C(16)-C(11)-C(12)	-173.8(8)
C(18')-C(16)-C(11)-C(12)	169.3(8)
C(15)-C(16)-C(11)-O(1)	-176.8(6)
C(18)-C(16)-C(11)-O(1)	13.7(11)
C(18')-C(16)-C(11)-O(1)	-3.1(10)
C(1)-O(1)-C(11)-C(12)	105.6(6)
C(1)-O(1)-C(11)-C(16)	-81.6(7)

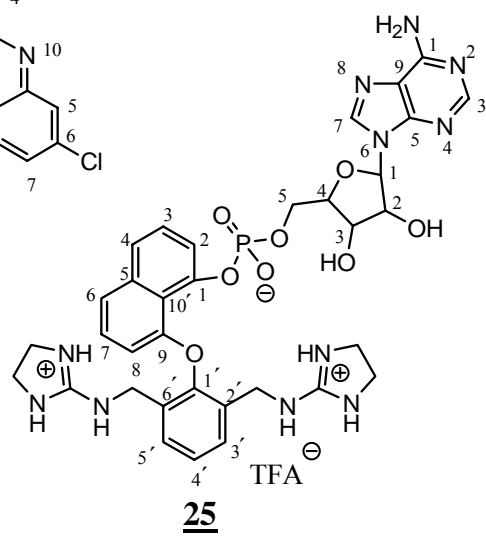
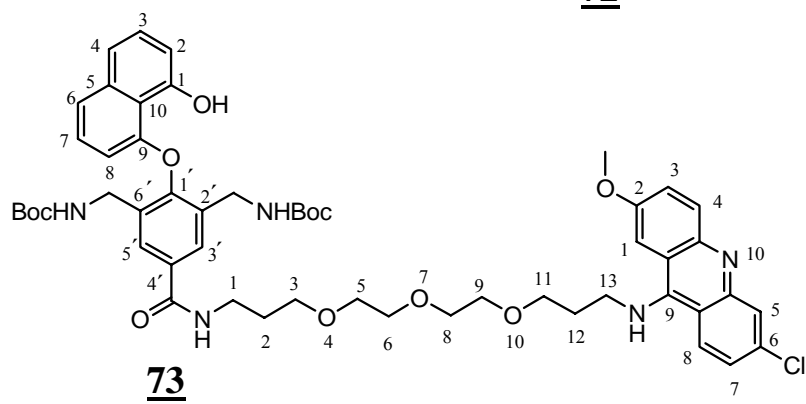
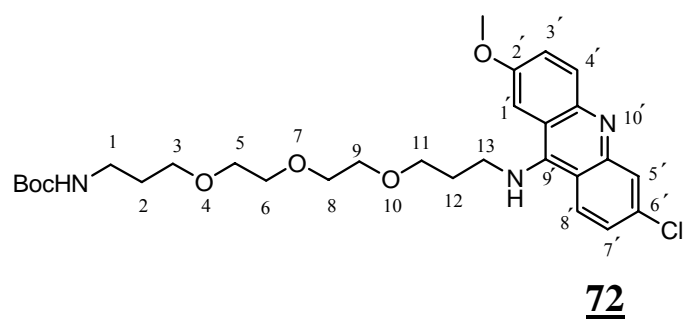
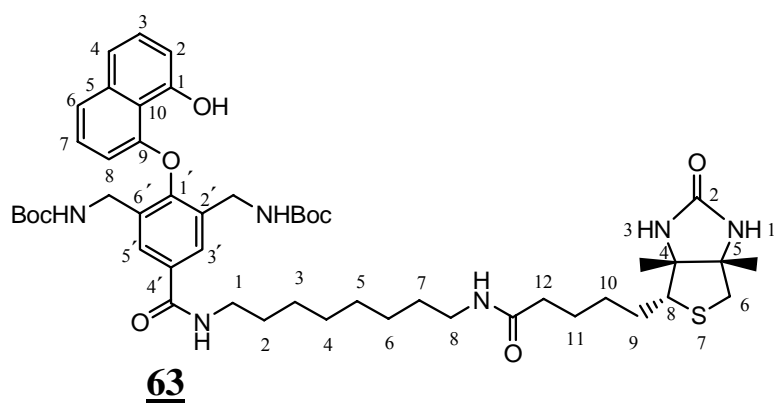
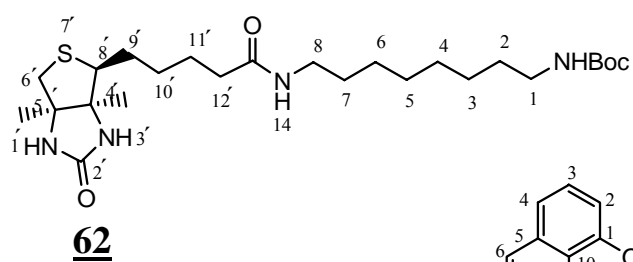
C(8)-C(7)-C(2)-C(3)	174.5(6)
C(6)-C(7)-C(2)-C(3)	-6.0(8)
C(8)-C(7)-C(2)-C(1)	-6.3(8)
C(6)-C(7)-C(2)-C(1)	173.2(5)
C(10)-C(1)-C(2)-C(3)	-173.2(6)
O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	10.3(8)
C(10)-C(1)-C(2)-C(7)	7.6(8)
O(1)-C(1)-C(2)-C(7)	-168.8(5)
O(1)-C(1)-C(10)-C(9)	172.4(6)
C(2)-C(1)-C(10)-C(9)	-3.9(9)
C(8)-C(9)-C(10)-C(1)	-1.5(9)
C(7)-C(2)-C(3)-C(4)	6.6(9)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-172.5(6)
C(7)-C(2)-C(3)-O(2)	-172.3(5)
C(1)-C(2)-C(3)-O(2)	8.5(9)
C(27)-C(26)-C(25)-O(10)	175.7(6)
N(6)-C(26)-C(25)-O(10)	-5.6(9)
C(27)-C(26)-C(25)-C(30)	-1.7(8)
N(6)-C(26)-C(25)-C(30)	176.9(5)
C(29)-C(30)-C(25)-O(10)	-177.3(6)
N(8)-C(30)-C(25)-O(10)	0.9(9)
C(29)-C(30)-C(25)-C(26)	0.2(8)
N(8)-C(30)-C(25)-C(26)	178.4(5)
O(14)-N(7)-C(28)-C(29)	4.2(8)
O(13)-N(7)-C(28)-C(29)	-176.0(5)
O(14)-N(7)-C(28)-C(27)	-175.8(6)
O(13)-N(7)-C(28)-C(27)	4.0(8)
C(11)-C(16)-C(15)-C(14)	3.2(10)
C(18)-C(16)-C(15)-C(14)	173.9(8)
C(18')-C(16)-C(15)-C(14)	-169.0(10)
O(7)-N(4)-C(22)-C(21)	-175.2(6)
O(6)-N(4)-C(22)-C(21)	6.9(9)
O(7)-N(4)-C(22)-C(23)	8.5(9)
O(6)-N(4)-C(22)-C(23)	-169.4(6)
C(10)-C(9)-C(8)-C(7)	2.7(10)

C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-178.1(6)
C(2)-C(7)-C(8)-C(9)	1.4(9)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	5.1(9)
C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	179.8(6)
C(2)-C(7)-C(6)-C(5)	0.3(9)
C(23)-C(22)-C(21)-C(20)	-1.6(10)
N(4)-C(22)-C(21)-C(20)	-177.8(6)
C(16)-C(15)-C(14)-C(13)	-0.2(10)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-1.9(10)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-1.0(9)
N(4)-C(22)-C(23)-C(24)	175.3(6)
N(6)-C(26)-C(27)-C(28)	-176.7(5)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	2.0(9)
C(29)-C(28)-C(27)-C(26)	-0.6(9)
N(7)-C(28)-C(27)-C(26)	179.4(6)
C(22)-C(21)-C(20)-N(3)	-173.9(6)
C(22)-C(21)-C(20)-C(19)	5.8(10)
O(5)-N(3)-C(20)-C(21)	-17.3(9)
O(4)-N(3)-C(20)-C(21)	160.6(7)
O(5)-N(3)-C(20)-C(19)	162.9(6)
O(4)-N(3)-C(20)-C(19)	-19.1(10)
O(3)-C(19)-C(20)-C(21)	169.1(6)
C(24)-C(19)-C(20)-C(21)	-6.9(9)
O(3)-C(19)-C(20)-N(3)	-11.2(10)
C(24)-C(19)-C(20)-N(3)	172.9(6)
C(22)-C(23)-C(24)-C(19)	-0.6(9)
C(22)-C(23)-C(24)-N(5)	-178.2(6)
O(3)-C(19)-C(24)-C(23)	-171.7(6)
C(20)-C(19)-C(24)-C(23)	4.3(9)
O(3)-C(19)-C(24)-N(5)	5.9(9)
C(20)-C(19)-C(24)-N(5)	-178.1(5)
O(9)-N(5)-C(24)-C(23)	-143.4(6)
O(8)-N(5)-C(24)-C(23)	37.1(8)
O(9)-N(5)-C(24)-C(19)	38.9(8)

O(8)-N(5)-C(24)-C(19)	-140.7(6)
O(2)-C(3)-C(4)-C(5)	177.5(6)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-1.5(10)
C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	-4.5(10)
N(8)-C(30)-C(29)-C(28)	-177.2(5)
C(25)-C(30)-C(29)-C(28)	1.0(9)
C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	-0.8(9)
N(7)-C(28)-C(29)-C(30)	179.1(5)

9.2 Atomnummierung von ausgewählten Naphtholverbindungen in der vorliegenden Arbeit:

**12****15****18****21****16****40****82****77****34****48****52**



9.3 Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
abs.	absolut(e, s, m)
ber.	berechnet
2,4-BDNPP 84	2,4-Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester 84
4-BNPP 86	2,4-Phosphorsäure-(4-dinitrophenyl)-ester 84
Boc	tert-Butoxycarbonyl
Cosy	Correlated Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
g	Gramm
gef.	Gefunden
HB	Hünig Base
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HOBt	Benzotriazol-1-ol
konz.	konzentriert(e)
LDA	Litiumdiisopropylamid
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minut(e)
NEt ₃	Triethylamin
4-MNPP 101	Phosphorsäuremethylester-4-nitrophenylester 101
NMO	4-Methylmorpholin-4-oxid-Monohydrat
PEG	Polyethylenglycol
PNA	Peptide nucleic acids
Rf	Ratio of fronts
RP	Reversed phase

RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
TBDMS	<i>tert</i> -Butyl-dimethyl-silan
Tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THP	Tetrahydropyran-2-yl
TMG	N,N,N',N'-Tetramethyguanidin(ium)
TPAP	Tetra-n-propylammonium-perruthenat

9.4 Literaturverzeichnis:

- 1 A Eschenmoser, Naturwissenschaften **1974**, 61, 513
- 2 a) O.P. Ward, Bioreaktionen, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg **1994**
b) J.E. Smith, Biotechnology, Third edition, Camgridge University Press **1996**
3. M. R. Redinbo, Wim G. J. Hol, Science **1998**, 279, 1504-1507
4. L. Stewart, M. R. Redinbo, Wim G. J. Hol, Science **1998**, 279, 1537-1540
5. M. R. Redinbo, Wim G. J. Hol, Biochemistry **2000**, 39, 6832-6840
- 6 M.-S. Muche, Dissertation **1996**, Johann von Wolfgang Goethe Universität: Frankfurt am Main
7. A. Büsing, Dissertation **2000**, Johann von Wolfgang Goethe Universität: Frankfurt am Main
8. Z. Nazir, Diplomarbeit **2000**, Johann von Wolfgang Goethe Universität: Frankfurt am Main
- 9 P. Zamecnik, M.L. Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci USA **1978**, 75, 280
10. K. Schmitz, U. Schepers, Angew. Chem. **2004**, 116, 2526-2529
- 11 A. Radzicka, R. Wolfenden, Science **1995**, 267, 90-93
- 12 a) G. R. J. Thatcher, R. Kluger, Adv. Phys. Org. Chem. **1989**, 25, 99
b) T. C. Bruice, S. L. Benkovic, Bioorganic Mechanismus, Vol. 2, Benjamin, New York **1966**
- 13 a) A. J. Kirby, W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc. **1965**, 87, 3209
b) A. J. Kirby, A. G. Varvoglis, J. Chem. Soc. (B) **1968**, 135
- 14 a) A. J. Kirby, M. Younas, J. Chem. Soc (B) **1970**, 510-513

- b) A. J. Kirby, M. Younas, J. Chem. Soc (B) **1970**, 1165
- 15 C. A. Bunton, S. L. Faber, J. Org. Chem. **1968**, 34, 767
- 16 A. Williams, Adv. Phy. Org. Chem. **1992**, 27, 1
- 17 J. Mulzer, T. Toda, S. Dhut, H. Shuntoh, T. Kuno, Nature **1999**, 399, 479-483
- 18 E. H. Serpersu, D. Shorte, A. S. Mildvan, Biochemistry **1987**, 26, 1289-1300
- 19 a) M. W. Göbel, J. W. Bats, G. Dürner, Angew. Chem **1992**, 104, 217-218
b) R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, Liebig's Ann. Chem **1994**, 49-58
c) R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, Liebig's Ann. Chem. **1994**, 205-210
d) G. Müller, G. Dürner, J. W. Bats, M. W. Göbel, Liebigs Ann. Chem. **1994**, 1075-1092
e) D. Reckenbeil, J. W. Bats, G. Dürner, M. W. Göbel, Liebigs Ann. Chem. **1994**, 1219-1229
- 20 B. Lenarcik, M. Gabryszewski, R. Czopek, Pol. J. **1990**, 64, 43-52
- 21 S. Patai, Z. Rappoport, „The Chemistry of amidines and imidates”, **1991**, John Wiley & Sons, Chichester
- 22 a) L. S. Lerman, J. Mol. Biol. **1961**, 3, 18
b) K. Schütz, Dissertation **1995**, Johann von Wolfgang Goethe Universität: Frankfurt am Main
- 23 J. Vinograd, J. Lebowitz, J. Gen. Physiol. **1966**, 49, 103-1025
- 24 T.-S. Hsieh, C. James, Biochemistry **1975**, 14, 527-535
- 25 W. Keller, Proc. Natl. Acad. Sci. **1975**, 72, 4876-4880
- 26 J. H. Corsa, J. H. Luttrupp, L. K. Falkow, Nature **1976**, 261, 516-519
- 27 T. D. Krizan, J. C. Martin, J. Org. Chem. **1982**, 47, 2681-2682
- 28 K. A. Parker, T. Iqbal, J. Org. Chem. **1980**, 45, 1149-1151
- 29 L. A. Cohen, J. A. Steele, J. Org. Chem. **1966**, 31, 2333
- 30 M. P. Paradisi, I. Torrini, Tetrahedron Lett. **1986**, 27, 5029
- 31 A. Pochini, G. Puglia, Synthesis, EN,11, **1983**, 906-907
32. A. W. Czarnik; et al, J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 10443-10448
- 33 Y. Zhang, J. Lu, J. Am. Chem. Soc **1957**, 79, 2544
- 34 T. Uchiyama, Y. Nakamura, T. M. Yukio, Bull. Chem. Soc. Jpn **1981**, 54, 181-185
- 35 Y. Kondo, T. Sakamoto, J. Am. Chem. Soc, **1999**, 121, 3539-3540
- 36 W. C. Chan, P. D. White (Hrsg.), “Fmoc Solid Peptide Synthesis”, Oxford University Press **2000**
- 37 J. J. Perkin, R. S. Meissner, Tetrahedron Letters, 40, **1999**, 1103-1106
- 38 W.-K. Xing, Y. Ogata, J. Org. Chem. **1982**, 47, 3577-3581
- 39 L. Wang, L. Zhou, Y. Zhang, Syn. Lett. **1999**, 7, 1065-1066

-
- 40 U. Kühn, R. Krämer, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 8125-8126
- 41 M. E. Branum, L. Que, Jr, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 1898-1904
- 42 R. G. Odgen, D. A. Adams, Methods Enzymol. **1987**, 152
- 43 B. Akermann, Biophys. **1997**, 74, 3140-3151
- 44 Boldron, Christophe, Bernard, Bioconjugate Chem. **2002**, 13, 1013-1020
- 45 K. D. Copeland, M. P. Fitzsimons, K. Jacqueline, Biochemistry **2002**, 41, 343-356
- 46 A. L. Smith, K. C. Nicolau, J. Med. Chem. 1996, 39, 2103-2117
- 47 J. Langowski, M. Tewes, DNA-Protein Interact. **2000**, 95-111
- 48 C. Goffin, W. G. Walter, Nucleic Acids Res. **1983**, 11, 8103-8109
- 49 M.-H. Baik, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 124, 4495-4503
- 50 X.-Y. Chen, V. L. Schramm, , J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 6527-6534
- 51 N. Khidekel, L. C. Hsieh-Wilson, J. Am. Chem. Soc. **2003**, 123, 16162-16163
- 52 V. Steullet, D. W. Dixon, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **1999**, 7, 2531-2540
53. N. Khidekel, P. K. Qasba, L. C. Hsieh-Wilson, J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 16162-16163
- 54 F. H. Zelder, A. A. Mokhir, R. Krämer, Inorg. Chem. **2003**, 42, 8618-8620
- 55 E. E. Baird, P. B. Dervan, J. Am. Chem. **1996**, 118, 6141-6146
- 56 P. B. Dervan, B. S. Edelson, Current Opinion in Structural Biology **2003**, 13, 284-299
57. Stefan Ullrich, geplante Diplomarbeit, **2004**, Johann von Wolfgang Goethe Universität: Frankfurt am Main